

**Effekte von Sulfadiazin-belasteten Schweinegülle auf die
Abundanz und Transferabilität von
Antibiotikaresistenzgenen in bakteriellen Bodengemeinschaften**

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften der
Technischen Universität Carolo-Wilhelmina
zu Braunschweig
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)
genehmigte
D i s s e r t a t i o n

von: Christoph Kopmann

Aus: Braunschweig

1. Referentin: apl. Prof. Dr. Kornelia Smalla

2. Referent: Prof. Dr. Dieter Jahn

eingereicht am: 20.07.2015

mündliche Prüfung (Disputation) am: 19.11.2015

Vorabveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch die Mentorin der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Publikationen

Holger Heuer, Christoph Kopmann, Chu T.T. Binh, Eva M. Top, Kornelia Smalla. 2008. Spreading antibiotic resistance through spread manure: characteristics of a novel plasmid type with low GC content. *Environmental Microbiology* 11: 937-949

Holger Heuer, Christoph Kopmann, Ute Zimmerling, Ellen Krögerrecklenfort, Kristina Kleineidam, Michael Schlöter, Eva M. Top, Kornelia Smalla. Effect of veterinary medicines introduced via manure into soil on the abundance and diversity of antibiotic resistance genes and their transferability. Chapter 23 in: *Antimicrobial Resistance in the Environment*. Wiley-Blackwell 2011: 453-456

Holger Heuer, Chu T.T. Binh, Sven Jechalke, Christoph Kopmann, Ute Zimmerling, Ellen Krögerrecklenfort, Thomas Ledger, Bernardo Gonzales, Eva M. Top, Kornelia Smalla. 2012. IncP-1 ϵ Plasmids are important vectors of antibiotic resistance genes in agricultural systems, diversification driven by class 1 integron gene cassettes. *Frontiers in Microbiology*, doi: 10.3389/fmicb.2012.00002

Christoph Kopmann+, Sven Jechalke+, Ingrid Rosendahl, Joost Groeneweg, Ellen Krögerrecklenfort, Ute Zimmerling, Viola Weichert, Jan Siemens, Wulf Amelung, Holger Heuer, Kornelia Smalla. 2013. Abundance and transferability of antibiotic resistance as related to the fate of sulfadiazine in maize rhizosphere and bulk soil. *FEMS Microbiology Ecology* 83: 125-134

Sven Jechalke+, Christoph Kopmann+, Ingrid Rosendahl, Joost Groeneweg, Viola Weichert, Ellen Krögerrecklenfort, Nikola Brandes, Mathias Nordwig, Guo-Chun Ding, Jan Siemens, Holger Heuer, Kornelia Smalla. 2013. Increased abundance and transferability of resistance genes after field application of manure from sulfadiazine-treated pigs. *Applied and Environmental Microbiology* 79: 1704-1711

Sven Jechalke, Christoph Kopmann, Mona Richter, Sylvia Moenickes, Holger Heuer, Kornelia Smalla. 2013. Plasmid-mediated fitness advantage of *Acinetobacter baylyi* in sulfadiazine-polluted soil. FEMS Microbiology Ecology Lett 348: 127-132
+ gemeinsame Erstautorenschaft

Tagungsbeiträge

Christoph Kopmann, Holger Heuer, Ellen Krögerrecklenfort, Viola Weichelt, Ute Zimmerling, Qodiah Solati, Eva Top, Kornelia Smalla. "Antibiotics entering soils via manure: from microcosms to the field experiment" (Vortrag), Julius Kühn-Institut, Institut für Epidemiologie und Pathogendiagnostik: Braunschweig 2011

Christoph Kopmann, Holger Heuer, Chu T.T. Binh, Ute Zimmerling, Viola Weichelt, Ellen Krögerrecklenfort, Joost Groeneweg, Kornelia Smalla. "Spreading manure means spreading antibiotic resistance, results from the mesocosm and field experiment (Vortrag). Projekt FOR 566 PhD Meeting: Braunschweig 2010

Christoph Kopmann, Holger Heuer, Ellen Krögerrecklenfort, Viola Weichelt, Ute Zimmerling, Qodiah Solati, Eva Top, Kornelia Smalla. "Transferable antibiotic resistance in soil and plant-associated bacteria: Effects of antibiotics introduced into soil via manure" (Vortrag), Julius Kühn-Institut, Institut für Epidemiologie und Pathogendiagnostik: Braunschweig 2010

Christoph Kopmann, Holger Heuer, Ellen Krögerrecklenfort, Ute Zimmerling, Kornelia Smalla. "Effects of veterinary medicines in manure on the abundance and transfer of bacterial antibiotic resistance genes in soil" (Vortrag), Julius Kühn-Institut, Institut für Epidemiologie und Pathogendiagnostik: Braunschweig 2009

Christoph Kopmann, Holger Heuer, Chu T.T. Binh, Kornelia Smalla. Effekte von Veterinärantibiotika und Gülle auf Abundanz, Diversität und Transfer von Antibiotika-Resistenzgenen in Boden und Pflanze-assoziierten Bakterien (Vortrag), Nachwuchswissenschaftlerforum des Julius Kühn-Instituts: Quedlinburg 2008

Posterbeiträge

Christoph Kopmann, Holger Heuer, Chu T.T. Binh, Ute Zimmerling, Viola Weichelt, Ellen Krögerrecklenfort, Joost Groeneweg, Kornelia Smalla. „Effects of veterinary medicines entering the soil via manure on the abundance and diversity of antibiotic resistance genes and mobile genetic elements“. DGHM VAAM Tagung: Hannover 2011

Christoph Kopmann, Holger Heuer, Ute Zimmerling, Ellen Krögerrecklenfort, Kornelia Smalla. „The rhizosphere and antibiotic treatment of pigs amplify the effect of manure fertilization on soil microbial communities“. Bageco 10, Uppsala, Schweden 2009

Christoph Kopmann, Holger Heuer, Chu T.T. Binh, Kornelia Smalla. “Effekte von Veterinärantibiotika und Gülle auf Abundanz, Diversität und Transfer von Antibiotika Resistenzgenen in Boden und Pflanzen-assoziierten Bakterien“. Nachwuchswissenschaftlerforum des Julius Kühn-Instituts: Quedlinburg 2009.

INHALTSVERZEICHNIS

Zusammenfassung.....	vii
1 Einleitung und Hintergrund.....	1
1.1 Antibiotika	2
1.1.1 Evolution der Antibiotika und der Antibiotikaresistenzen	3
1.1.2 Die Entdeckung der Antibiotika durch den Menschen	3
1.1.3 Übersicht über die Hauptklassen der Antibiotika	4
1.1.4 Antibiotika in der Veterinärmedizin.....	8
1.1.5 Antibiotikaeintrag in landwirtschaftlich genutzte Flächen	10
1.1.6 Wurzelfreier Boden und Rhizosphäre	11
1.2 Antibiotikaresistenzen.....	12
1.2.1 Herkunft und Vorkommen	12
1.2.2 Mechanismen	13
1.2.3 Horizontaler Gentransfer	14
1.2.4 Plasmide.....	18
1.2.5 Inkompatibilitätsplasmide	20
1.3 Sulfonamide	21
1.3.1 Sulfonamide und Sulfonamid-Resistenz.....	21
1.3.2 Nachweis von Sulfadiazin-Resistenzgenen in Umweltproben, kultivierungsabhängige Methoden.....	23
1.3.3 Nachweis von Sulfadiazin-Resistenzgenen in Umweltproben, kultivierungsunabhängige Methoden	23
1.4 Zielsetzung der Arbeit.....	26
2 Material und Methoden	27
2.1 Experimentelle Designs.....	28
2.1.1 Experimentelles Design Mesokosmos.....	28
2.1.2 Experimentelles Design Feldversuch	31
2.1.3 Experimentelles Design Mikrokosmos Braunschweig	32
2.1.4 Experimentelles Design Wirtssuche	33
2.2 Gülleherstellung für den Feldversuch.....	34
2.3 Extraktion der Antibiotika.....	35
2.4 DNA-Extraktion und denaturierende Gradientengelelektrophorese (DGGE) von amplifizierten 16S-Genfragmenten aus Gemeinschafts-DNA	35
2.5 Detektion und Quantifizierung der Zielgene.....	36
2.6 Exogene Plasmidisolation.....	36
2.7 Plasmidextraktion.....	37
2.8 Charakterisierung der extrahierten Plasmide	37
2.9 Statistische Analysen.....	38
2.10 Abundanz des <i>A. baylyi</i> BD413 und Anteil der plasmidhaltigen Zellen.....	38

2.11	Selektionskoeffizient	40
2.12	Sequenzierung und Accession Numbers	40
3	Ergebnisse und Diskussion	41
3.1	Abundanz und Transferabilität von Antibiotikaresistenzgenen in Beziehung zu dem Schicksal von Sulfadiazin in der Mais-Rhizosphäre und im nicht durchwurzelten Boden.....	42
3.1.1	Zusammenfassung	43
3.1.2	Verbleib des SDZ und seiner Metabolite im Boden.....	43
3.1.3	Effekt von SDZ-belasteter Gülle auf bakterielle Gemeinschaften im nicht durchwurzelten Boden und in der Rhizosphäre	45
3.1.4	Relative <i>sul</i> -Genabundanz in Bezug auf die SDZ-Konzentration	50
3.1.5	Gewinnung und Charakterisierung von Antibiotikaresistenzplasmiden.....	52
3.1.6	Fazit	55
3.2	Erhöhte Abundanz und Transferabilität von Resistenzgenen nach Feldapplikation von Gülle von Sulfadiazin-behandelten Schweinen	56
3.2.1	Zusammenfassung	57
3.2.2	Einfluss der wiederholten Gülleapplikation auf die relative <i>sul</i> -Genabundanz	57
3.2.3	Eintrag der <i>sul</i> -Gene durch die Gülle und ihre Selektion im Boden	60
3.2.4	Der Effekt der SDZ-Gülle auf die Rhizosphäre verglichen mit nicht durchwurzeltem Boden	61
3.2.5	Die Effekte der Zeit, des Kompartiments und der Behandlung auf die relativen <i>sul</i> -Abundanzen	63
3.2.6	Transferabilität von Sulfonamidresistenzgenen und den „Low GC-Plasmiden“	64
3.2.7	Der Rhizosphäreneffekt auf die Transferabilität der SDZ-Resistenz.....	65
3.2.8	Fazit	68
3.3	Plasmidvermittelter Fitnessvorteil von <i>Acinetobacter baylyi</i> in Sulfadiazin-belastetem Boden.....	70
3.3.1	Zusammenfassung	71
3.3.2	Ergebnisse und Diskussion.....	71
3.3.3	Fazit	77
3.4	Wirtsbereichsbestimmung des Plasmids pHHV216 und Charakterisierung des Einflusses der Rhizosphäre auf den Fitnessvorteil plasmidtragender <i>Acinetobacter baylyi</i> -Populationen in Sulfadiazin-belastetem Boden	78
3.4.1	Zusammenfassung	79
3.4.2	Ergebnisse Wettbewerbsversuch	79
3.4.3	Selektionskoeffizient.....	81
3.4.4	Potentielle Wirte von pHHV216	81
3.4.5	Diskussion	83
3.4.6	Fazit	87
4	Abschließende Diskussion	89

4.1	Die Gülle als Vektor von Antibiotika und resistenten Bakterien in landwirtschaftlich genutzten Flächen	90
4.2	Der Verbleib von Sulfadiazin in der Rhizosphäre	97
4.3	Kurzzeiteffekte von SDZ-belasteter Gülle auf bakterielle Bodengemeinschaften..	99
4.4	Langzeiteffekte von SDZ-belasteter Gülle auf bakterielle Bodengemeinschaften..	102
4.5	Relevanz der Ausbringung von antibiotikabelasteten Güllen für die Humanmedizin	104
4.6	Fazit.....	105
4.7	Abgleich der Zielstellung dieser Arbeit mit den Ergebnissen	105
5	Tätigkeitsangaben zu den Veröffentlichungen	111
6	Literatur	115
7	Danksagung.....	125
8	Abkürzungen	129

Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurden die Effekte von Sulfadiazin-belasteten Schweinegülle auf die Abundanz und Transferabilität von SDZ-Resistenzgenen in bakteriellen Bodengemeinschaften in der Rhizosphäre und im nicht-durchwurzelter Boden untersucht.

Im Mesokosmosversuch konnten wir zeigen, dass der Eintrag von Schweinegülle sowie von Sulfadiazin (SDZ)-belasteter Schweinegülle die Abundanz und Transferabilität der SDZ-Resistenzgene erhöht. Die absolute und relative Abundanz der SDZ-Resistenzgene (*sul1* und *sul2*) wurde durch quantitative PCR-Analysen von (total Community) Gemeinschafts-DNA aus den entsprechenden Proben ermittelt. Die Transferabilität der SDZ-Resistenzgene wurde durch exogene Plasmidisolierung ermittelt.

Im Feldversuch untersuchten wir erstmals die Effekte von Gülle SDZ-behandelter Schweine im Vergleich zu Gülle unbehandelter Schweine auf die Abundanz und Transferabilität von SDZ-Resistenzgenen in bakteriellen Bodengemeinschaften über einen Zeitraum von 175 Tagen. Dieser Versuch zeigte ebenfalls eine erhöhte Abundanz der Resistenzgene *sul1* und *sul2* im Boden, der mit SDZ-belasteter Gülle behandelt wurde. Eine Akkumulation von *sul1* und *sul2* nach wiederholter Begüllung konnte im Feldversuch nicht gezeigt werden, stattdessen nahm die Abundanz der Resistenzgene bei wiederholter Begüllung über die Zeit wieder ab. Dies zeigt, dass Umweltfaktoren wie z.B. Temperatur und Feuchtigkeitsschwankungen die Abundanz von Resistenzgenen über die Zeit maßgeblich beeinflussen könnten.

Pflanzen geben bis zu 50 % des assimilierten Kohlenstoffs in Form von Wurzelexsudaten über die Wurzeln an den Boden ab. Dieses erhöhte Nährstoffaufkommen in der Rhizosphäre fördert das mikrobielle Wachstum, was möglicherweise den Effekt des bakteriostatisch wirkenden SDZ sowie den horizontalen Gentransfer verstärkt. Zur Untersuchung des Einflusses der Rhizosphäre auf die Abundanz und Transferrate von Resistenzgenen wurden Mais und Gras als Modellsysteme ausgewählt, da sie typischerweise begüllte Pflanzen darstellen. Die Arbeit zeigte, dass die SDZ-Resistenzgenabundanz vor und nach der SDZ-Inokulation in der Rhizosphäre geringer ist als im nicht durchwurzelter Boden. Allerdings wird auch gezeigt, dass die Differenz der Resistenzgenabundanz zwischen Kontrolle und SDZ-Behandlung in der Rhizosphäre über die Zeit größer wird, während sie im nicht durchwurzelter Boden gleich bleibt, was auf einen länger anhaltenden Selektionsprozess hindeutet.

In unseren Experimenten wurde überwiegend eine Plasmidgruppe gefunden, die eine SDZ-Resistenz über die *sul*-Gene vermitteln. Das Plasmid pHHV216 (*sul* 2) gehört zu der Gruppe von „Low GC-Plasmiden“, die einen sehr niedrigen GC-Gehalt aufweisen. Im letzten Teil dieser Arbeit wurde durch Mikrokosmosexperimente gezeigt, dass sich dieses Plasmid in dem gleichen Boden des Feldexperiments bei Selektionsdruck durch SDZ anreichern, und somit wurde bewiesen, dass es SDZ-Resistenz in bakteriellen Bodengemeinschaften vermitteln kann. Dazu wurde ein Mikrokosmosexperiment entwickelt, in dem eine *Acinetobacter*-Population, zur Hälfte mit dem pHHV 216-Plasmid ausgestattet, in mit Gülle und SDZ-Gülle behandelte Böden eingebracht wurde. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden die bakteriellen Fraktionen der Böden extrahiert und durch Plattieren auf *Acinetobacter*-spezifisch selektivem Medium die *Acinetobacter*-Zellzahlen erstellt. Die Plasmidhaltigkeit der Population wurde durch Übertragen der *Acinetobacter*-Kolonien auf Plasmid-spezifisch selektivem Medium ermittelt.

Des Weiteren wurde ein Ansatz durchgeführt, der einige der möglichen Wirte des pHHV216-Plasmids im Boden identifiziert. Dazu wurde das Plasmid in *E. coli* in den Boden eingebracht um nach vier Wochen die bakterielle Fraktion zu isolieren und auf Plasmid-spezifisch selektivem Medium zu plattieren. Die gewachsenen Kolonien wurden dann nach Vereinzelung und Überprüfung der Plasmidhaltigkeit durch 16S rRNA-PCR mit anschließender Sequenzanalyse identifiziert.

1 Einleitung und Hintergrund

1.1 Antibiotika

Antibiotika gehören zu den weltweit am häufigsten verschriebenen Medikamenten, geschätzte 13 % aller produzierten Medikamente sind Antibiotika. Ihre jährliche Produktion beläuft sich mittlerweile auf etwa 100.000 Tonnen (Beck, 2001), und sie sind für einen Anstieg der weltweiten Lebenserwartung der Menschen von bis zu 10 Jahren verantwortlich (McDermott & Rogers, 1982). Dieser breite Einsatz von Antibiotika birgt allerdings auch Risiken; so wurden Antibiotika und Antibiotikarückstände in vielen ökologischen Systemen gefunden, z.B. in Abwässern, Grund- und Oberflächenwasser sowie im Boden.

Ein anteilmäßig großer Eintrag von Antibiotika in die Umwelt findet über Fäkalien von behandelten Tieren statt. Die jährliche Abgabe von Antibiotika an deutsche Tierärzte ist leicht rückläufig, betrug im Jahr 2013 laut einer Erhebung des Bundesamts für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL) aber immerhin noch 1.452 Tonnen (BVL, 2013). Im Jahr 2011 produzierten in Deutschland 26,9 Millionen Schweine und 12,6 Millionen Rinder ca. 200 Millionen Tonnen Gülle, die auf deutschen Äckern als Dünger ausgebracht wurden (Füssler, 2011).

Bis zu 90 % der verabreichten Antibiotika werden von den Tieren wieder ausgeschieden und gelangen über die Gölledüngung in biologisch aktiven Konzentrationen auf landwirtschaftlich genutzte Flächen. Die bakteriellen Gemeinschaften des Bodens stellen ein großes Reservoir von bekannten und unbekannten Antibiotikaresistenzgenen dar. Durch den Eintrag von Antibiotika in die Umwelt entsteht in den bakteriellen Gemeinschaften ein Selektionsdruck, der einerseits die Anreicherung von intrinsisch resistenten Bakterien, andererseits die Mobilisierung und Entstehung neuer Antibiotikaresistenzgene und die Übertragung auf humanpathogene Keime fördert. Diese Entwicklung gefährdet zunehmend den erfolgreichen Einsatz von Antibiotika in der Humanmedizin. Über diesen Zusammenhang zwischen dem Eintrag von Antibiotika in die Umwelt und dem vermehrten Auftreten von multiresistenten Krankheitserregern ist wenig bekannt.

Diese Arbeit entstand im Rahmen der Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG)-Forschergruppe 566, die sich mit dem Schicksal und den Effekten von SDZ in landwirtschaftlich genutzten Böden beschäftigte. Ziel war die Untersuchung der Effekte von SDZ-belasteter Schweinegülle auf die Abundanz sowie Transferabilität von SDZ-Resistenzgenen in bakteriellen Bodengemeinschaften sowie des Einflusses von Pflanzen auf diese Effekte.

1.1.1 Evolution der Antibiotika und der Antibiotikaresistenzen

Antibiotika und Antibiotikaresistenzen gab es schon lange vor dem medizinischen Einsatz durch den Menschen. Einige Studien schätzen, dass ihr Ursprung mehrere hundert Millionen Jahre zurück liegt. Hall & Barlow (2004) vermuten, dass die Serin β -Lactamase (Details zu den Substanzen siehe 1.1.3) vor ungefähr 2 Milliarden Jahren von Bakterien entwickelt wurde, während Baltz (2006) das Alter des Erythromycins auf 800 Millionen Jahre und das Alter des Streptomycins auf 600 Millionen Jahre datiert. Bis zum Ende des 20. Jahrhunderts ging man - basierend auf den wenigen damals bekannten Charakteristika der Antibiotika - davon aus, dass die Antibiotika ausschließlich der chemischen Kriegsführung der Bakterien um Nahrungsquellen und Lebensräume im Kampf gegen Konkurrenten dienen. Dementsprechend ordnete man die Antibiotikaresistenzen als durch Co-Evolution entwickelten Selbstverteidigungsmechanismus von Antibiotika-produzierenden Bakterien ein (Davies & Davies, 2010). In den letzten Jahren wuchs mit den immer diffizileren Techniken zur Erforschung der Genetik und Ökologie der Bakterien das Verständnis, dass es sich bei den Antibiotika eher um Moleküle handelt, die dem Quorum Sensing und der Zell-Zell-Kommunikation (Linares *et al.*, 2006, Davies & Davies, 2010, Gillings, 2013) sowie der Regulierung der metabolischen Funktion (Martinez, 2009) dienen und erst in sehr hohen Konzentrationen Wachstum inhibieren oder töten. Dass der Ursprung der Antibiotika vermutlich nicht in der chemischen Kriegsführung liegt, wird durch zwei interessante Fakten nahe gelegt. Die minimalen Inhibitionskonzentrationen von Antibiotika werden in der Umwelt (ohne anthropogenen Einfluss) sehr selten erreicht, und Gillings (2013) schätzt, basierend auf zwei Studien (Goh *et al.*, 2002, Linares *et al.*, 2006), dass 5 % aller bakteriellen Promotoren durch Antibiotika beeinflusst werden. Während die Antibiotikaproduktion bis zum 20. Jahrhundert ausschließlich von den Bakterien und Pilzen geleistet wurde, ist heutzutage der Mensch der größte Produzent der Antibiotika.

1.1.2 Die Entdeckung der Antibiotika durch den Menschen

Erste Ansätze der Menschen, infektiöse Krankheiten mit Chemikalien zu bekämpfen, finden sich bereits im alten Ägypten, Babylon, im Fernen Osten und bei den Inkas (Bottcher, 1964). Der Begriff ‚Antibiotika‘ umschreibt Substanzen, die Bakterien töten oder bakterielles Wachstum hemmen, und leitet sich von dem Begriff ‚Antibiose‘ ab. Von Paul Vuillemin 1889 geprägt, der eine Arsenverbindung (Arsphenamin) entdeckte, die das Wachstum von Syphilis-Erregern unterdrückte (Vuillemin, 1889), beschreibt

Antibiose einen Zustand, in dem ein Lebewesen in völligem Gegensatz zu einem anderen steht. Zwischen der erneuten Entdeckung der Antibiotika Ende des 19. Jahrhunderts und der Entwicklung von Synthese- und Gewinnungsverfahren sowie therapeutischer Anwendung vergingen noch einmal 40 Jahre. In diesen 40 Jahren gab es etliche Meilensteine der Erforschung der Antibiotika; hervorgehoben sei hier die Beschreibung von Pasteur und Joubert der Inhibierung des Anthrax-Erregers durch einen aus der Luft stammenden Organismus (Pasteur & Joubert, 1877) sowie die Arbeit von Alexander Fleming. Er beschrieb zwar nicht als erster die Antibiose zwischen Pilz und Bakterium, erforschte und beschrieb aber ohne Zweifel als erster die Substanz Penicillin (Fleming, 1929). Die erste erfolgreiche Therapie eines Patienten gelang 1941 mit Penicillin und hat die Humanmedizin revolutioniert (Abraham *et al.*, 1941). Antibiotika sind Zellgifte, die an spezifisch prokaryotischen Charakteristika wirken, z.B. Zellaufbau und Metabolismus, ohne die eukaryotischen Zellen zu beeinflussen. Dies prädestiniert sie zur Bekämpfung von bakteriellen Infektionen an Eukaryoten, also an Mensch, Tier und Pflanze. Mit Hilfe der Antibiotika konnten erstmals etliche Krankheiten wie z.B. Blutvergiftung, Lungenentzündung und Syphilis erfolgreich bekämpft und andere wie die Pocken sogar fast besiegt werden, was die menschliche Lebenserwartung weltweit um geschätzte 10 Jahre erhöhte (McDermott & Rogers, 1982). Die GERMAP-Studie 2008 schätzt die jährliche Anwendung von Antibiotika in der Humanmedizin in Deutschland auf 250-300 Tonnen, während sie den Verbrauch in der Veterinärmedizin auf 784,4 Tonnen beziffert. (BVL, 2008). Einige Antibiotika und deren Determinanten sind relativ biostabil und werden durch menschliche Ausscheidungen in der Umwelt angereichert (Cabello *et al.*, 2013).

1.1.3 Übersicht über die Hauptklassen der Antibiotika

Zwischen 1940 und 1962 wurden mehr als 20 neue Antibiotikaklassen, seit 1962 nur noch zwei weitere neue Antibiotikaklassen entdeckt (Coates *et al.*, 2011). Mittlerweile gibt es Hunderte von antibiotischen Medikamenten, die aufgrund ihrer Struktur und ihres Wirkmechanismus an der bakteriellen Zelle in verschiedene Gruppen eingeteilt werden können. Der Wirkmechanismus der für die Veterinärmedizin wichtigsten Klassen sei hier kurz erläutert. Grundsätzlich kann man sagen, dass die in der Veterinär- und Humanmedizin benutzten Antibiotikaklassen überwiegend identisch (World Health Organization, 2014) und über 80 % der klinisch angewendeten Antibiotika Naturprodukte bzw. semi-synthetische Derivate von Bodenbakterien sind (Kieser *et al.*, 2000).

Man unterscheidet bei Antibiotika zwei verschiedene Wirkmechanismen, entweder sind sie bakteriostatisch, das heißt, sie töten nur wachsende Bakterien und verhindern so das Wachstum von Bakterienpopulationen, oder sie sind bakteriozid, das heißt, sie töten vorhandene Bakterien.

Die größte und älteste Gruppe ist die der β -Lactam-Antibiotika. Sie macht mehr als die Hälfte der weltweit hergestellten Antibiotika aus (Kong *et al.*, 2010). Alle β -Lactam-Antibiotika haben einen namensgebenden β -Lactam-Ring, mit dem sie kovalent und irreversibel an Transpeptidasen binden. Diese Enzyme werden deswegen auch als Penicillin-bindende Proteine (PBPs) bezeichnet. Die PBPs katalysieren die Querverbindungen von zwei glycanverbundenen Peptidketten, den Hauptkomponenten Gram-positiver Zellwände, und werden über die Bindung mit den β -Lactam-Antibiotika inhibiert. Das „Abfangen“ der PBPs bei der Zellwandsynthese kann zur Veränderung der Zellmorphologie oder zu Löchern in der Mureinschicht führen (Kong *et al.*, 2010), so dass die Zellwand nicht mehr selektiv permeabel ist und die Bakterien ihre Zytoplasmakonzentrationen nicht regulieren können. Dies führt zur Nährstoffverdünnung innerhalb der Zelle, und unter extremen Bedingungen diffundiert aufgrund der hohen Protein- sowie Ionenkonzentration so viel Wasser in die Zelle, dass sie platzt (Kong *et al.*, 2010) (Abbildung 1). Diese Gruppe der Antibiotika gilt als nicht biostabil oder nicht umweltpersistent, das heißt, sie ist in der Umwelt nicht lange nachweisbar, was einerseits mit der relativ hohen Verbreitung von β -Lactamasen, β -Lactam-Ring zerschneidenden Enzymen (Kong *et al.*, 2010), sowie andererseits einer molekülbedingten kurzen Halbwertszeit von einigen Tagen (Boxall *et al.*, 2004) zu erklären ist. Dafür wird diese Substanz als mobil eingestuft, was ihre Fähigkeit beschreibt, vom Boden ins Oberflächenwasser zu wandern (Boxall *et al.*, 2004, Monteiro & Boxall, 2010).

Die Glykopeptide wirken ebenfalls bei der Zellwandsynthese von Gram-positiven Bakterien, jedoch hemmen sie nicht die dafür notwendigen Enzyme, sondern binden sich an die Peptidoglykan Moleküle, die die Basismoleküle zur Ausbildung der Mureinschicht sind. Dadurch können die Enzyme, die die Mureinschicht bilden, nicht an die Zellwand binden, was ebenfalls zu Löchern in der Zellwand führt (Yim *et al.*, 2014). Dieser membranolytische Effekt führt zum Tod des Bakteriums (Abbildung 1). Die Gruppe der Glykopeptid-Antibiotika wurde 1953 entdeckt, als man in einer Bodenprobe nach Antibiotika-produzierenden Bakterien suchte. Man fand das Vancomycin-produzierende Bakterium *Amycolatopsis orientalis* (Yim *et al.*, 2014).

Ebenfalls an der Zellwand setzt die Gruppe der Polypeptid-Antibiotika an. Polypeptid-Antibiotika sind endogene Polypeptide, die von mehrzelligen Organismen als Schutz gegen pathogene Mikroben produziert werden (Zasloff, 2002). Sie besitzen ein breites Wirkspektrum gegen Gram-positive wie -negative Bakterien sowie einige Viren und Pilze (Zasloff, 2002). Sie sind so konstruiert, dass sie sich in die Zellwände der Bakterien einlagern und so Öffnungen in der Zellwand verursachen, die eine Kontrolle der Zytoplasmakonzentrationen verhindern (Seo *et al.*, 2012). Sie sind bakteriozid; ein Vertreter dieser Gruppe ist das Bacitracin (Abbildung 1).

Polyketide finden als Breitbandantibiotika Verwendung, das heißt, sie können gegen Gram-positive wie Gram-negative Bakterien eingesetzt werden. 1947 fand man bei der Suche nach einem Antibiotika-produzierenden Bakterium in einer Bodenprobe das Chlortetracyclin produzierende *Streptomyces aureofaciens* (Duggar, 1948). Polyketide binden sich an die Ribosomen der Bakterien und hemmen die Proteinbiosynthese, sie wirken also bakteriostatisch. Man unterscheidet innerhalb dieser Gruppe zwischen den Tetracyclinen, die an der 30S Ribosomenuntereinheit binden und so die Anlagerung der tRNA (Transport-Ribonukleinsäure) verhindern (Griffin *et al.*, 2010), und den Makrolid-Antibiotika, die sich an die 50S Ribosomenuntereinheit binden und die Entlassung der Proteine in das Zytoplasma verhindern (Jenke-Kodama & Dittmann, 2009) (Abbildung 1). Die Gruppe der Makrolid-Antibiotika gilt als „etwas oder leicht“ umweltpersistent und „etwas oder leicht“ umweltmobil und wurde schon im Klärschlamm sowie im Flusswasser nachgewiesen (Monteiro & Boxall, 2010). Die Tetracycline werden als umweltpersistent und immobil beschrieben und wurden schon im Flusswasser sowie in Fisch, im Boden und im Getreide nachgewiesen (Monteiro & Boxall, 2010).

Die Gruppe der Aminoglycosid-Antibiotika bindet ebenfalls an die 30S Ribosomenuntereinheit, allerdings wird die Proteinsynthese nicht gestoppt, sondern so manipuliert, dass Nonsense-Proteine entstehen, die das Bakterium nicht nutzen kann (Hermann, 2007) (Abbildung 1). Die Antibiotika wirken bei Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien und sind bakteriozid, ein Vertreter dieser Gruppe ist z.B. das Streptomycin.

Die Gruppe der Chinolone sind Breitbandantibiotika, die die DNA-Gyrase (DNA = desoxyribonucleic acid, deutsch: DNS = Desoxyribonukleinsäure) inhibieren. DNA-

Gyrasen sind notwendig um Spannungen in den verdrehten DNA-Strängen abzubauen. Die DNA-Gyrasen schneiden, entdrillen und verbinden die DNA-Stränge wieder. Die Chinolone binden sich inhibierend an die DNA-Gyrasen und führen so über die Verhinderung der Replikation sowie Translation der DNA zum Tode des Bakteriums (Guan *et al.*, 2013) (Abbildung 1). Sie werden ausschließlich synthetisch hergestellt. Im Jahr 1962 entdeckte man als ersten Vertreter dieser Gruppe die Nalidixinsäure (Ball, 2000); ein Vertreter dieser Gruppe ist z.B. das Difloxacin. Die Gruppe der Chinolone wird in drei Generationen eingeteilt. Bei der zweiten und dritten Generation wurden an die Grundstruktur der Chinolone Moleküle angehängt, die dem Antibiotikum neue Wirkung verliehen, da sie bestehende Chinolon-Resistenzmechanismen aushebelten. Die dritte Chinolon-Generation bilden die Fluorchinolone, die als persistent, aber mobil kategorisiert werden und schon in Flusswasser, im Klärschlamm sowie im Boden detektiert wurden (Monteiro & Boxall, 2010).

Die letzte große Gruppe der Antibiotika sind die ausschließlich synthetisch hergestellten Sulfonamide, auf die in einem späteren Kapitel dieser Einleitung noch genauer eingegangen wird. Sulfonamide sind Breitbandantibiotika, die analoge Strukturelemente zur p-Aminobenzoesäure aufweisen. Diese ist das Substrat für die Dihydropteroat-Synthase, ein essentielles Enzym des Folsäurezyklus, der wiederum die Grundlage der DNA-Synthese bei Bakterien darstellt. Durch kompetitive Inhibierung der Dihydropteroat-Synthase werden somit das Wachstum und die Vermehrung der Bakterien gestört, die Sulfonamide wirken bakteriostatisch (Sköld, 2000) (Abbildung 1). Ein Vertreter dieser Gruppe ist z.B. Sulfadiazin. Die Gruppe der Sulfonamide gilt als persistent und mobil und wurde schon im Boden, in Flusswasser, im Klärschlamm, im Grundwasser sowie im Getreide detektiert (Monteiro & Boxall, 2010).

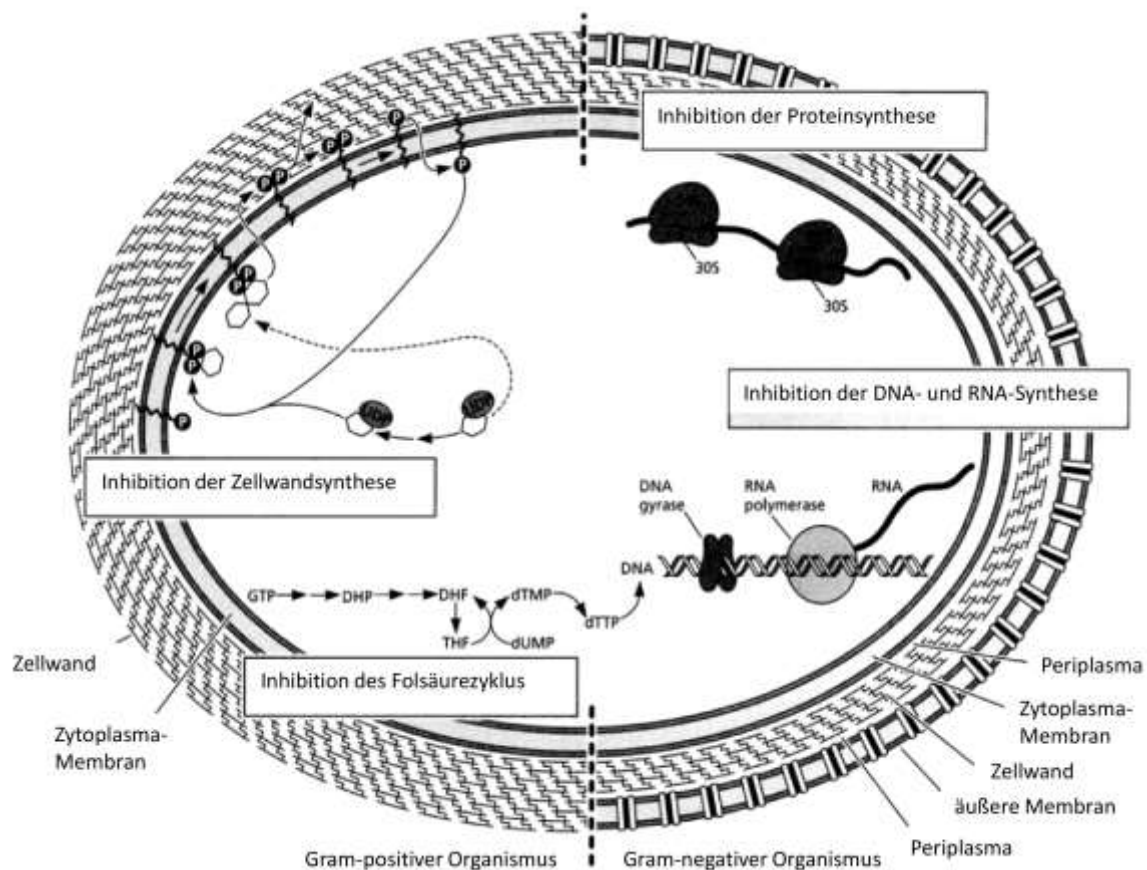


Abbildung 1: Die verschiedenen Ansatzpunkte der Antibiotika in bakteriellen Zellen, modifiziert nach Walsh (2006).

1.1.4 Antibiotika in der Veterinärmedizin

Nahezu zeitgleich zu der Anwendung von Antibiotika in der Humanmedizin kam es zur Anwendung von Antibiotika in der Veterinärmedizin (Gustafson, 1985). Ein wesentlicher Beitrag war die erfolgreiche Synthese von Sulfonamiden, einer bakteriostatisch wirkenden Substanzgruppe, ebenfalls in den 40er Jahren des 20. Jahrhunderts (Sköld, 2000).

Der Einsatz von Antibiotika in der Veterinärmedizin erfasst heutzutage alle Formen der Tierzucht und findet Verwendung in aquatischen sowie ländlichen Produktionsbetrieben (Kemper, 2008). Antibiotika dienen hier der Bekämpfung von Infektionen. Ist ein Tier einer Herde erkrankt, bekommt die gesamte Herde Antibiotika; diese Form der Applikation wird Metaphylaxe genannt. Zudem haben Antibiotika in geringen Konzentrationen einen leistungs- und wachstumsfördernden Effekt auf die Tiere, was ebenfalls die Verabreichung dieser Medikamente aus wirtschaftlichen Gründen förderte. Kümmerer (2003) beziffert die eingesetzte Menge von Antibiotika in der Europäischen Union (EU) und der Schweiz für das Jahr 1999

auf 13.288 Tonnen, davon wurden 29 % (ca. 3.853 Tonnen) in der Veterinärmedizin und 6 % (ca. 797 Tonnen) als Wachstums promotoren eingesetzt. Die Anwendung von Antibiotika als Wachstums promotoren in der Tierzucht wurde 2006 vom Europäischen Parlament verboten (EUFIC, 2006).

Die GERMAP-Studie 2008 (BVL, 2008) hat den Verbrauch von in Deutschland in der Veterinärmedizin eingesetzten Antibiotika für das Jahr 2005 auf 784,4 Tonnen beziffert. Neuere Erhebungen des BVL, die die Abgabemenge von Antibiotika an deutsche Tierärzte erfassen, zeigen einen leichten Rückgang von 1.706 Tonnen im Jahr 2011 auf 1.452 Tonnen im Jahr 2013 (BVL, 2013). Allerdings nahm z.B. die Abgabe an Fluoroquinolonen über diesen Zeitraum von 8 auf 12 Tonnen zu. Den größten Anteil der ausgegebenen Antibiotika hatten Tetracycline, Lactam-Antibiotika, Sulfonamide, Makrolide und Polypeptid-Antibiotika (Abbildung 2).

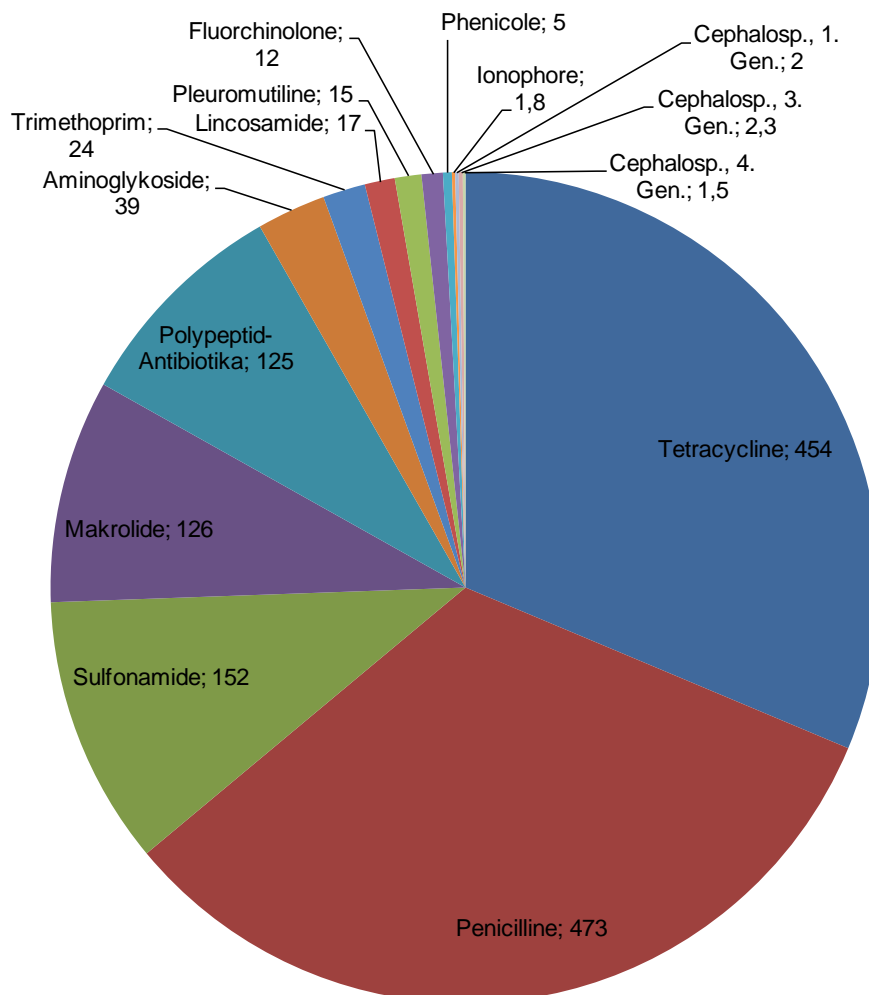


Abbildung 2: Antibiotikaabgabemengen in der Veterinärmedizin in Deutschland 2013 (BVL, 2013). Dargestellt ist die antimikrobiell wirksame Grundsubstanz je

Wirkstoffklasse in Tonnen. Wirkstoffklassen mit Abgabemengen unterhalb einer Tonne sind hier nicht dargestellt.

1.1.5 Antibiotikaeintrag in landwirtschaftlich genutzte Flächen

Traditionell werden die Fäkalien von Schweinen und Rindern (Gülle) zum Düngen von landwirtschaftlich genutzten Flächen verwendet. In Deutschland produzierten 26,9 Millionen Schweine und 12,7 Millionen Rinder im Jahr 2011 über 200 Millionen Tonnen Gülle, die auf Äckern und Wiesen ausgebracht wurden (Füssler, 2011).

Ein großer Teil der an die Tiere verabreichten Antibiotika wird wieder ausgeschieden. Dieser Vorgang ist abhängig von der Pharmakinetik und den Transformationsprozessen im Tier (Jechalke *et al.*, 2014). Heuer *et al.* (2008b) haben aufgezeigt, dass über 90 % des Schweinen verabreichten SDZ von den Tieren wieder ausgeschieden wurde. (Lamshöft *et al.*, 2007, 2010) berichtet, dass über Düngung der Felder mit SDZ-belasteter Schweinegülle SDZ in biologisch aktiven Mengen den Boden kontaminiert.

Sarmah *et al.* (2006) schätzten, dass zwischen 30 und 90 % der in der Human- und Veterinärmedizin verwendeten Antibiotika den Verdauungstrakt biologisch aktiv verlassen.

Roberts (2012) hat die Auswirkungen des Einsatzes von Tetracyclinen in der industriellen Tierzucht untersucht und dabei eine Transmission sowie Anreicherung von Tetracyclin und Tetracyclin-Resistenzdeterminanten in vielen Biotopen nachweisen können. Ihr Fazit lässt sich auf viele Klassen der Antibiotika übertragen. Antibiotika und Antibiotikaresistenzdeterminanten werden heutzutage durch Wind, Wasser, Waren und Menschen weltweit bewegt/transportiert und tragen so zum ubiquitären Vorkommen der Resistenzen bei (Roberts, 2012).

Bei den β -Lactam-Antibiotika hingegen sind weder das Antibiotikum noch seine Abbauprodukte nach der Passage durch das Schwein nachweisbar (Boxall *et al.*, 2004, Binh *et al.*, 2007).

Eine generelle Risikobewertung des Antibiotikaeintrags in landwirtschaftlich genutzte Flächen durch Gülle ist derzeit nicht möglich, da die verwendeten Antibiotika das gesamte Spektrum der Antibiotikaprodukte abdecken und jedes Antibiotikum in Kombination mit dem einzelnen Tier und dem jeweiligen Boden untersucht werden müsste (Jechalke *et al.*, 2014).

1.1.6 Wurzelfreier Boden und Rhizosphäre

Will man die Effekte der Antibiotika auf bakterielle Bodengemeinschaften in landwirtschaftlich genutzten Flächen untersuchen, so muss man diese Gemeinschaften in zwei unterschiedliche Lebensräume einteilen. Zum einen gibt es den nicht durchwurzelter Boden, der ein recht statisches oligotrophes Biotop ist; Nährstoffeintrag sowie bakterielle Mobilisation stellen sich nur durch externe Faktoren wie z.B. Regen oder Begüllung ein. Die meiste Zeit sind die Bakterien dort in einer Art „Ruhezustand“. Hinzu kommt eine Separierung der Bakterien auf einzelne Koloniehërde, die nicht im Kontakt zueinander stehen. Man geht davon aus, dass dort die Verteilung der Bakterien durch die Bodentextur sehr inhomogen ist (Oades, 1993).

Demgegenüber steht die Rhizosphäre, der Bodenanteil, der von der Wurzel beeinflusst wird. Diese ist ein sehr dynamischer Lebensraum, da einerseits ein konstanter Nährstoffeintrag über Wurzelexsudate gewährleistet ist und andererseits auch durch die Wurzeloberfläche eine zusammenhängende Kolonisierungsplattform besteht, an der die verschiedenen Bakterien aufeinandertreffen. Kuzyakov & Domanski (2000) haben gezeigt, dass Getreide und Weidepflanzen bis zu 50 % des assimilierten Kohlenstoffs in Form von Wurzelexsudaten in den Boden transferieren. Smalla *et al.* (2001) konnten mit Hilfe molekularer Fingerprints zeigen, dass die Abundanz verschiedener dominanter Bakterienstämme an Wurzeln vom Pflanzenalter sowie von der Pflanzenart abhängig ist. Innerhalb dieses Projektes werden erstmalig die unterschiedlichen Reaktionen dieser beiden verschiedenen bakteriellen Lebensgemeinschaften im nicht durchwurzelter Boden und der Rhizosphäre auf das Antibiotikum SDZ untersucht.

1.2 Antibiotikaresistenzen

1.2.1 Herkunft und Vorkommen

Die Gesamtheit der bakteriellen Antibiotikaresistenzgene wird Resistom genannt. Liu & Pop (2009) haben eine Datenbank für Antibiotikaresistenzgene ins Leben gerufen, in der bis heute über 20.000 Resistenzgene gelistet sind.

Zur Entstehung von Resistenzen bedarf es immer eines Selektionsdrucks in Kombination mit z.B.: einer Mutation oder einer Genvervielfältigung (mehr dazu in 1.2.2). Antibiotika-produzierende Bakterienstämme besitzen Antibiotikaresistenzen, da sie als erste dem Selektionsdruck ausgesetzt sind. Eine Studie hat verschiedene *Actinomyceten*-Stämme (Antibiotikaproduzenten) auf die Resistenz gegen 21 verschiedene Antibiotika geprüft und konnte im Durchschnitt 7-8 verschiedene Resistenzen pro Stamm nachweisen (D'Costa *et al.*, 2006). Da das System der Antibiotikaresistenzen ursprünglich als Kommunikationssystem bakterieller Gemeinschaften entstanden ist (Davies & Davies, 2010), verwundert es nicht, dass viele Resistenzgene und potentielle Resistenzgene (z.B. Efflux-Pumpen-Gene) auch in nicht Antibiotika-produzierenden Bakterienstämmen gefunden werden (Gillings, 2013).

Das Reservoir der heutigen Antibiotikaresistenzen in der Umwelt besteht aus einem Mix von natürlich vorkommenden Antibiotikaresistenzen und Antibiotikaresistenzen, die man in menschlichen und tierischen Ausscheidungen findet und die durch anthropogenen Selektionsdruck entstanden sind (Wellington *et al.*, 2013). Verschiedene Studien legen den Schluss nahe, dass Antibiotikaresistenzgene mit anthropogenem Ursprung im bakteriellen Resistom akkumulieren; so konnte z.B. eine Studie aufzeigen, dass ESBL (extended spectrum beta lactamase, als Beispiel für ein durch menschlichen Selektionsdruck entstandenes Resistenzgen) produzierende *Klebsiella pneumoniae* in allen Stufen der Aufbereitung klinischer Abwässer nachgewiesen wurden (Prado *et al.*, 2008). Eine weitere Studie (Knapp *et al.*, 2010) hat das Vorkommen von Resistenzgenen in Bodenproben von 1940 (der Prä-Antibiotikazeit) bis 2008 untersucht. Die Abundanz der Antibiotikaresistenzgene steigt in dieser Studie mit fortlaufender Zeit und besonders „dramatisch“ ab dem Jahr 1970 an, was den menschlichen Einfluss auf die zunehmende Abundanz der Resistenzgene unterstreicht.

Zur Verbreitung der Antibiotikaresistenzen bedarf es nicht unbedingt eines Selektionsdrucks. Als Beispiel haben Sjolund *et al.* (2008) Darmbakterien von 97 arktischen Vögeln (aus Sibirien, Nordgrönland und Alaska) auf resistente Bakterien

untersucht und festgestellt, dass 8 % der gefundenen *E. coli*-Isolate über eine oder mehrere Resistenzen verfügten, obwohl diese Vögel und ihre Umwelt wohl niemals Kontakt zu Antibiotika hatten.

Die Anreicherung dieser Resistenzen wiederum beruht auf entsprechendem Selektionsdruck und/oder auf Co-Selektion dieser Gene, wenn sie auf mobilen genetischen Elementen (mehr dazu in 1.2.3-1.2.4) liegen, die noch zusätzliche Antibiotikaresistenzen vermitteln (Wellington *et al.*, 2013).

1.2.2 Mechanismen

Nahezu zeitgleich mit der Entdeckung der Antibiotika entstand die Problematik von Entwicklung und Selektion von Antibiotikaresistenzen in Bakterien durch Antibiotika. Bakterien können intrinsisch resistent sein, das heißt, das Antibiotikum wirkt nicht gegen ein Bakterium; ein β -Lactam-Antibiotikum wird z.B. mit der Zellwand von Mycoplasma-Bakterien nicht interagieren, da diese kein Peptidoglycan in der Zellwand aufweisen.

Ob ein Bakterium gegenüber einem Antibiotikum resistent ist oder nicht hängt also von der Klasse des Antibiotikums, der bakteriellen Spezies sowie deren genetischer Ausstattung ab.

Antibiotikaresistenzen sind so vielfältig wie die Bakterien, dennoch kann man sie anhand ihres Mechanismus in sechs Gruppen einteilen (Normark & Normark, 2002):

- (1) Verminderter Import von Antibiotika, z.B. durch mutierte Porine, die den Eintritt des Antibiotikums in die Zelle verhindern.
- (2) Erhöhter Antibiotika-Export, z.B. durch die häufig in Gram-negativen Bakterien vorkommenden Efflux-Pumpen, deren Produktion oder Aktivität heraufreguliert wird und die somit das Antibiotikum schneller aus der Zelle befördern als es in sie eindringen kann.
- (3) Inaktivierung oder Modifizierung des Antibiotikumzieles, z.B. durch Ausbildung eines modifizierten ribosomalen Proteins, das keine Bindestelle mehr für das Antibiotikum aufweist.
- (4) Einführung eines neuen Antibiotikumzieles, z.B. binden Sulfonamide aufgrund ihrer Struktur analogie zur p-Aminobenzoessäure an die Dihydropteroinsäure-Synthetase, die den Folsäurezyklus katalysiert. Durch Produktion einer alternativen Dihydropteroinsäure-Synthetase, die eine höhere Bindungsaffinität gegenüber der p-Aminobenzoessäure aufweist, wird das Bakterium resistent gegenüber Sulfonamiden.
- (5) Hydrolyse des Antibiotikums, z.B. durch β -Lactam-hydrolysierende Enzyme.

- (6) Modifizierung des Antibiotikums, z.B. durch Aminoglycosid-modifizierende Enzyme.

Antibiotikaresistenzen können von Bakterien erworben werden, z.B. über horizontalen Gentransfer, man nennt die Bakterien dann extrinsisch resistent.

Heuer & Smalla (2007) konnten nachweisen, dass SDZ sowie Gülle die Abundanz der SDZ-Resistenzgene *sul1* und *sul2* in bakteriellen Bodengemeinschaften über zwei Monate signifikant erhöhte.

Rosendahl *et al.* (2011) haben aufgezeigt, dass ein Teil des via Begüllung in den Boden eingebrachten SDZ sich an Bodenpartikel bindet und über einen längeren Zeitraum sich in geringen Konzentrationen wieder löst bzw. biologisch verfügbar wird.

Gullberg *et al.* (2011) konnten nachweisen, dass Antibiotika auch in geringsten Mengen einen selektierenden Effekt auf die entsprechenden Resistenzgene im Boden haben können.

Young & Crawford (2004) haben aufgezeigt, dass manche bakteriellen Bodengemeinschaften sogar über die Fähigkeit verfügen, Antibiotika abzubauen, und Tappe *et al.* (2013) konnten kürzlich erst ein SDZ abbauendes Bakterium beschreiben, während Topp *et al.* (2013) ein Sulfamethazin degradierendes Bakterium gefunden haben.

1.2.3 Horizontaler Gentransfer

Horizontaler Gentransfer (HGT) beschreibt die Übertragung von Genen bei Bakterien über die Artgrenzen hinweg. Smets & Barkay (2005) benennen den HGT als Hauptmechanismus der Natur zur Geninnovation vor der sexuellen Reproduktion.

Es gibt drei Formen der Genübertragung, die Konjugation via Plasmide oder konjugative Transposons, die Transduktion via Viren sowie die Transformation, also die Aufnahme von freier DNA. Bakterien sind ständig wechselnden Selektionsbedingungen ausgesetzt und brauchen daher eine hohe Flexibilität sowie Widerstandsfähigkeit. Die Möglichkeit, ihr Genom durch Mutation oder Chromosomenumlagerung an veränderte Selektionsbedingungen zielgerichtet anzupassen, ist begrenzt. Aus diesem Grund besitzen die meisten Bakterien die Fähigkeit, neue Gene via HGT aus der Umwelt zu akquirieren, da es die effektivste Methode zu sein scheint, sich an neue Lebensbedingungen zu adaptieren (Smets & Barkay, 2005, Musovic *et al.*, 2010, Heuer & Smalla, 2012). Die Möglichkeit, gesamte Genome zu sequenzieren und zu analysieren, hat gezeigt, dass die meisten

Bakterien einen hohen Anteil an aufgenommenen Genen (unterschiedlicher GC-Gehalt sowie Vorkommen bei phylogenetisch entfernten Spezies) besitzen, und hat zu dem Modell des Kerngenoms (Abbildung 3) und des flexiblen Genoms geführt (Thomas, 2000, Heuer *et al.*, 2008b). Im Kerngenom befinden sich alle überlebenswichtigen Gene der Bakterien, also die Gene, die dem Zellerhalt und der Replikation dienen sowie die Gene, die den Ökotyp der Spezies festlegen. Das flexible Genom hingegen ist geprägt durch eine hohe genetische Flexibilität und Plastizität, die dem Organismus die Fähigkeit gibt, sich über Generwerb schnell an sich ändernde Umweltbedingungen wie z.B. Antibiotika-Selektionsdruck anzupassen, also seine Flexibilität zu erhöhen (Thomas, 2000, Hacker *et al.*, 2004, Heuer *et al.*, 2008b). Es zeichnet sich durch eine Modularität aus, die es den Bakterien ermöglicht, Gene schnell zu integrieren, und sie ist geprägt durch hohe Raten an Genverlust sowie Generwerb.

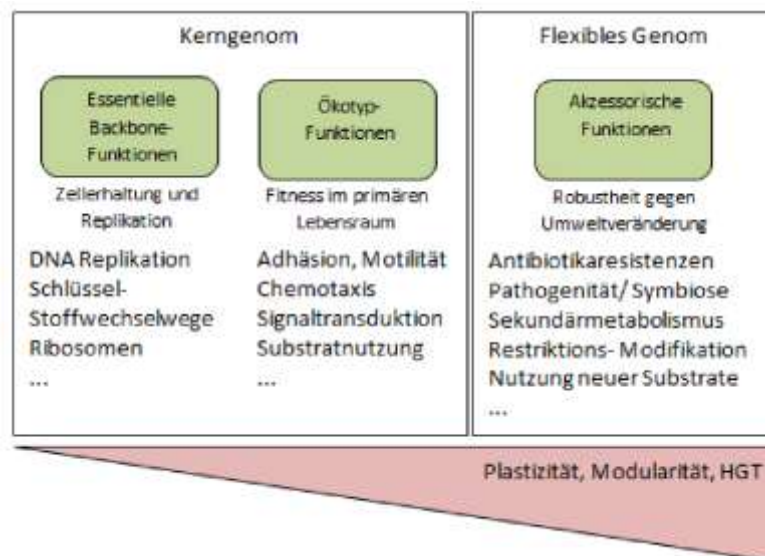


Abbildung 3: Schema des Kerngenoms und des flexiblen Genoms, das die genetischen Unterschiede einer Population, hervorgerufen durch verschiedene Selektionsbedingungen, erklärt; modifiziert nach Heuer *et al.* (2008a).

Die Möglichkeit, gesamte Genome zu sequenzieren und zu analysieren, führte auch weg von der baumartigen Evolutionsstruktur der Bakteriengenome hin zu der netzartigen Evolutionsstruktur der Bakteriengenome. Diese Entwicklung wird durch den Fakt unterstrichen, dass ein beachtlicher Anteil der meisten bakteriellen Genome aus horizontal erworbenen Genen besteht (Nakamura *et al.*, 2004).

Der HGT ist somit der wichtigste Evolutionsfaktor von Bakterien und die effektivste Form von Mikroorganismen, sich an veränderte Lebensbedingungen anzupassen (Smets & Barkay, 2005, Musovic *et al.*, 2010, Heuer & Smalla, 2012). Die

Verbreitung von Antibiotikaresistenzen in bakteriellen Gemeinschaften über Plasmide ist durchaus üblich (Thomas & Nielsen, 2005, Musovic *et al.*, 2010, Heuer & Smalla, 2012). Die drei Grundformen des HGT seien hier kurz erläutert.

I. Bei der **Konjugation** werden Gene, die meistens in einer ringförmigen, extrachromosomalen DNA-Struktur vorliegen, den so genannten Plasmiden, von einer Donorzelle auf eine Rezipientenzelle übertragen. Bei diesem Prozess entsteht eine Zell-Zell-Verbindung, durch die ein Strang der doppelsträngigen DNA in die Rezipientenzelle wandert, wobei die beiden Einzelstränge während der Konjugation schon wieder komplementiert werden. Bei den meisten Gram-negativen Bakterien startet die Komplementierung des einzelsträngigen Plasmids am Replikationsursprung und läuft bidirektional ab, so dass ein doppelsträngiges Zwischenprodukt entsteht, das so genannte Theta-Zwischenprodukt. Bei den meisten Gram-positiven Bakterien spaltet sich der doppelsträngige Plasmidstrang, wobei ein einzelner Strang übertragen wird und der andere in der Zelle verbleibt, es entsteht also ein einzelsträngiges Zwischenprodukt. Beide Einzelstränge werden noch während der Konjugation komplementiert, diese Variante bezeichnet man als Rolling circle-Mechanismus. Am Ende des Prozesses sind also beide Zellen Donoren. Die für den Transport notwendigen Gene (*tra*-Gene) liegen meistens auf dem Plasmid selbst (konjugatives Plasmid), können aber auch im Chromosom des Donors vorhanden sein. Dieser Prozess konnte bei Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien nachgewiesen werden, wenn auch mit Unterschieden. Bei Gram-negativen Bakterien finden sich Donor und Rezipient über den Sexpilus, eine auf der Membran des Donors liegende Struktur, an die sich der Rezipient anheftet. Der Sexpilus wird dann abgebaut, bis eine Zell-Zell-Verbindung vorliegt. Bei Gram-positiven Bakterien erfolgt die Donor-Rezipienten-Findung oft über Pheromone und die Donor-Rezipienten-Bindung über eine so genannte Aggregationsbrücke.

II. Die **Transduktion** bezeichnet die Übertragung von Bakteriengen durch Viren. Viren besitzen kein eigenes Replikationssystem und sind deswegen auf die Infizierung von Zellen mit Replikationssystemen angewiesen. Ist eine Zelle mit einem Virus infiziert, hat der Virus also seine DNA/RNA in eine Zelle injiziert, so nutzt er das Replikationssystem der Wirtszelle zur Replikation, bis er aufgrund mangelnder Produktion eigener essentieller Enzyme und Moleküle stirbt. Diesen Vorgang bezeichnet man als lytische Infektion. Nach dem Tod der Wirtszelle lysiert diese und setzt die neue Generation Viren frei. Es kommt vor, dass die Viren, die sich in der

Wirtszelle replizieren und zusammensetzen, zufällig Bakterien-DNA in den Viruskörper integrieren, die bei der erneuten Infektion eines Bakteriums übertragen wird. Diesen Vorgang nennt man unspezifische Transduktion.

Es gibt Viren, die quasi eine Infektionspause einlegen und ihr Erbgut in das Erbgut der Wirtszelle an spezifischen Stellen integrieren. Dadurch wird der Wirt nicht geschädigt und das Virus hängt sein Überleben an das Überleben der Wirtszelle. Diesen Vorgang bezeichnet man als lysogene Infektion. Treten bei der Wirtszelle bestimmte Stressfaktoren auf, die auf den möglichen Tod der Zelle hindeuten, geht das Virus in den lytischen Zustand über, wobei es durch ungenaues Herausschneiden der Virus-DNA aus der Wirts-DNA Teile der bakteriellen DNA mit sich nimmt. Bei dieser Form der Transduktion werden nicht spezifische Gene übertragen, und die übertragenen Teile der Bakterien-DNA unterliegen eher einer statistischen Wahrscheinlichkeit, wo sich das Virus im Genom einbaut. Diesen Vorgang nennt man spezifische Transduktion. Die Bedeutung der Transduktion für die Übertragung von Bakteriengenomen kann nur schwer beurteilt werden. Allerdings gibt die Tatsache, dass die meisten der sequenzierten Bakterien eine hohe Anzahl von Prophagensequenzen in ihrer DNA aufweisen (Gillings, 2014) sowie andererseits eine hohe Prophagendichte im Boden vorhanden ist (Ashelford *et al.*, 2003), einen Hinweis darauf, dass der HGT über Prophagen durchaus üblich ist.

III. Als Transformation wird der Vorgang bezeichnet, bei dem eine Bakterienzelle „nackte“ oder freie DNA aus der Umwelt aufnimmt. Nach dem Tod einer Zelle lysiert diese, das heißt, die Zellstrukturen lösen sich auf und der Inhalt einschließlich der DNA wird in die Umwelt entlassen. Zusätzlich haben viele Bakterien Mechanismen entwickelt, nicht nur DNA aktiv aus der Umwelt aufzunehmen, sondern sie auch in die Umwelt abzugeben. Abiotische Faktoren wie pH-Werte, Bodenfeuchte und Temperatur bestimmen die Überdauerung der DNA und somit ihre Verfügbarkeit für die Bakteriengemeinschaften (Widmer *et al.*, 1996). Die Fähigkeit, nackte DNA aus der Umwelt aufzunehmen, wird als Kompetenz bezeichnet; sie benötigt eine komplexe Maschinerie aus 20 bis 50 Proteinen (*com* Gene) (Thomas & Nielsen, 2005) und ist von spezifischen Umweltfaktoren abhängig (Berka *et al.*, 2002, Heuer & Smalla, 2007). Der entscheidende Faktor bei der Transformation ist die Bakterienart selbst; so gibt es Stämme, die besonders häufig und schnell DNA erwerben können, die besonders kompetent sind, wie z.B. *S. pneumoniae* und *Acinetobacter baylyi* (Thomas & Nielsen, 2005). Die meisten der natürlich transformierbaren Bakterien entwickeln eine zeitlich begrenzte Kompetenz

in Abhängigkeit äußerer Umwelteinflüsse, wie z.B. sich ändernder Wachstumsbedingungen, Nährstoffzugabe oder Abwesenheit oder Zelldichte (Thomas & Nielsen, 2005).

Die Bedeutung der Transformation für den Erwerb von neuen Genen durch Bakterienzellen in der Umwelt kann nur schwer abgeschätzt werden (Wackernagel *et al.*, 1998).

1.2.4 Plasmide

Plasmide sind mobile, extrachromosomale, meist ringförmige Strukturen, die in Bakterien vorliegen können. Sie sind nicht essentiell zum Überleben der Bakterien und replizieren autonom. Ihre Größe variiert zwischen einigen kb bis zu 1000 kb. (Amabilecuevas & Chicurel, 1992), während ihre Kopienzahl in der Zelle zwischen einer und einigen hundert schwanken kann (Osborn *et al.*, 2000) und vom Plasmid sowie von der Plasmid-Wirt-Interaktion reguliert wird. Es können mehrere verschiedene Plasmide in einer Zelle vorliegen. Sie sind ein wichtiges Werkzeug des HGT (Davison, 1999, Thomas & Nielsen, 2005, Heuer & Smalla, 2012), da sie den Genpool eines Bakteriums in der Regel mit Selektionsvorteilen erweitern, z.B. durch Antibiotikaresistenzen, Pathogenitäts- oder Virulenzfaktoren, komplette Stoffwechselwege oder Schwermetallresistenzen (Thomas & Nielsen, 2005, Heuer & Smalla, 2012). Diese Selektionsvorteile garantieren das Überleben der Plasmide in den Bakterien, da sie den plasmidfreien Bakterien gegenüber einen Selektionsvorteil bieten (Ricci & Hernandez, 2000) und somit die Wachstumsvorteile der plasmidfreien Bakterien durch geringere DNA-Replikationskosten sowie -dauer aufheben (Bergstrom *et al.*, 2000).

Die strukturelle Organisation der Plasmide ist mosaikartig und lässt sich generell in zwei Teile einteilen. Eine Region, die so genannte Backbone Region, beherbergt die für die Konjugation, Etablierung und Replikation des Plasmids notwendigen Gene (Osborn *et al.*, 2000, Thomas, 2000). Diese Region ist eine sehr konservierte Region, die durch wenige Schnittstellen von Restriktionsenzymen geprägt ist, da diese nach erfolgreicher Konjugation von den Restriktionssystemen der Rezipientenzelle gegenselektiert werden. Der andere Teil des Plasmids kann Gene beinhalten, die dem Wirt einen Selektionsvorteil vermitteln und den Phänotyp der Zelle verändern. Er wird akzessorische Region genannt (Osborn *et al.*, 2000, Thomas, 2000). Diese Region ist geprägt von vielen verschiedenen mobilen genetischen Elementen (MGE) wie Transposons, IS-Elementen und Integrans sowie vielen Schnittstellen für Restriktionsenzyme (Osborn *et al.*, 2000, Thomas & Nielsen,

2005), die die chromosomale Anreicherung der Selektionsvorteile bietenden Gene fördern.

Ein Plasmid, das in phylogenetisch verschiedene Bakterien transferieren, replizieren und stabil persistieren kann, wird „Broad Host Range Plasmid“ genannt (Hill & Top, 1998) - ein Plasmid mit einem breiten Wirtsspektrum. Dementsprechend gibt es auch „Narrow Host Range Plasmids“, Plasmide mit einem engen Wirtsspektrum, die nur in eine Bakterienspezies oder in phylogenetisch nahe verwandte Bakterien transferieren, replizieren und persistieren.

Das Wirtsspektrum eines Plasmids hängt von drei Faktoren ab: Transport, Etablierung und Replikation; sie werden im Folgenden näher erläutert.

I. Der Transport des Plasmids in die Rezipientenzelle, die Art der Konjugation: Unabhängig davon, ob das Plasmid die Konjugationsgene oder Transportgene (*tra* Gene) selber trägt oder sie im Chromosom des Donors vorliegen, muss die Konjugationsform des Donors zum Rezipienten passen. Viele Plasmide besitzen die für den Transfer notwendigen Gene nicht. Sie können durch andere Plasmide, die über die für den Transfer notwendigen Gene verfügen, von einem Bakterium zum anderen mobilisiert werden (Thomas & Nielsen, 2005). Hierfür werden in der Regel spezielle *mob* Gene benötigt, die am Ursprung des Transfers ein Relaxsome bilden. Ein Konjugationssystem, das mit Sexpili ausgestattet ist, kann mit einem Gram-positiven Bakterium keine Zell-Zell-Verbindung herstellen, die für den Transport des Plasmids in den Rezipienten notwendig ist.

II. Die Etablierung eines Plasmids in der Wirtszelle: Bakterien haben ein System entwickelt, um sich gegen das Eindringen fremder DNA, meist Phagen-DNA, zu wehren. Dieses System beruht im Wesentlichen auf zwei verschiedenen Enzymgruppen, den Methyltransferasen und den Restriktionsenzymen. Restriktionsenzyme binden sequenzspezifisch an DNA und zerschneiden diese durch Hydrolyse in kleinere Fragmente. Methyltransferasen schützen die zelleigene DNA, indem sie diese durch Methylierung markieren, speziell die Bereiche, die eine Restriktionsschnittstelle aufweisen. Das Methylierungsmuster verhindert also das Anlagern der Restriktionsenzyme. Ist ein Plasmid in eine Zelle transferiert worden, muss es das richtige Methylierungsmuster tragen bzw. die Erkennungssequenzen für die Methyltransferasen besitzen, um markiert zu werden. Des weiteren sollte es

keine Restriktionsschnittstellen außerhalb des Methylierungsmusters besitzen, um nicht doch hydrolisiert zu werden.

III. Die **Replikation**, speziell die Art des Replikationsapparates: Die Plasmide benötigen zur stabilen Replikation den Replikationsapparat des Wirtes. Passen die Enzyme des Wirtes nicht genau zur DNA-Struktur des Plasmids, z.B. bei einem unterschiedlichen GC-Gehalt, so wird dieses bei der Zellteilung des Wirtes nicht oder fehlerhaft repliziert, was zum Aussterben des Plasmids in der Wirtspopulation führt. Die Gruppe der Broad Host Range Plasmide umgeht diesen Engpass, indem sie Replikationsgene (*rep* Gene) trägt, die entweder eine geringe DNA-Spezifität aufweisen, und/oder sie selbst trägt für die Replikation wichtige Enzyme, die normalerweise vom Wirt genutzt werden, z.B. das RSF1010, IncQ-Plasmid (Thomas & Nielsen, 2005).

1.2.5 Inkompatibilitätsplasmide

Es gibt eine große Gruppe von Plasmiden, die sich dadurch auszeichnet, dass sie eine Co-Existenz innerhalb eines Wirtes mit einem anderen Plasmid unterbindet, die so genannten Inkompatibilitätsplasmide. Es gibt verschiedene Gruppen von Inkompatibilitätsplasmiden, wobei sich Plasmide innerhalb einer Gruppe ausschließen, während sie mit Plasmiden einer anderen Inkompatibilitätsgruppe oder mit "nicht-Inkompatibilitätsgruppen zugehörigen" Plasmiden co-existieren können.

Plasmide einer Inkompatibilitätsgruppe besitzen denselben Mechanismus zur Replikation, sind also miteinander verwandt. Bei der Zellteilung beobachtet man, dass nur ein Plasmid derselben Inkompatibilitätsgruppe innerhalb des Wirtes repliziert wird, was zum Verlust des zweiten Plasmids in den Tochterzellen führt.

1.3 Sulfonamide

1.3.1 Sulfonamide und Sulfonamid-Resistenz

Sulfonamide gehören zu den ältesten Antibiotika, die vom Menschen verwendet werden. Sie wurden in den 1930er Jahren entdeckt und finden seitdem Anwendung in der Human- sowie Veterinärmedizin. Sulfonamide binden aufgrund ihrer Strukturanalogie kompetitiv zur p-Aminobenzoessäure (Abbildung 4) an die Dihydropteroinsäure-Synthetase (DHPS), die den Folsäurezyklus katalysiert. Der Folsäurezyklus ist von elementarer Bedeutung für die Synthese der DNA-Bausteine, der Pyrimidine und Purine. Ist der Folsäurezyklus inhibiert, kann eine Zelle keine neue DNA bilden.

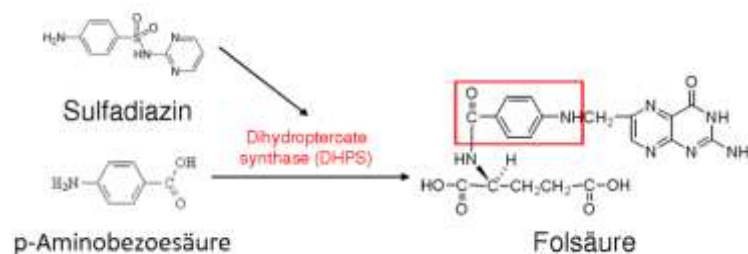


Abbildung 4: Chemische Struktur der Sulfonamide sowie der p-Aminobenzoessäure. Der Angriffspunkt des Sulfadiazins bei der Folsäuresynthese ist schematisch dargestellt.

Eine Sulfonamid-Resistenz entsteht durch eine Mutation in dem *folP* Gen, die zu einer alternativen DHPS führt, die wiederum eine höhere Bindungsaffinität zur p-Aminobenzoessäure aufweist. Dadurch wird der inhibierende Effekt der Sulfonamide umgangen und die Zelle kann die Purin- und Pyrimidin-Synthese fortsetzen (Sköld, 2000, Perreten & Boerlin, 2003). Der Mensch besitzt keinen eigenen Folsäurezyklus, er bezieht seine Purine und Pyrimidine aus der im Darm angesiedelten bakteriellen Gemeinschaft. Dieser Fakt prädestiniert die Sulfonamide zur Nutzung als Antibiotikum, da der Stoffwechsel des Menschen nicht beeinflusst und nur der Stoffwechsel der Bakterien inhibiert wird. Das mutierte *folP* Gen kann chromosomal oder via Plasmide lokalisiert werden.

Bis jetzt sind drei Gene bekannt, die solch eine alternative DHPS codieren: *sul1*, *sul2* und *sul3*.

Das *sul1* Gen wurde 1988 von Sundström auf einem Transposon (*Tn21*) in Verbindung mit anderen Antibiotikaresistenzgenen auf dem Plasmid R388 entdeckt (Sundström *et al.*, 1988).

Im selben Jahr entdeckte Radstrom und Swedberg das *sul2* Gen, das auf einem Inkompatibilitätsplasmid der Gruppe IncQ (RSF1010) lokalisiert war (Radstrom & Swedberg, 1988). Die beiden DHPS-Gene haben zu 57 % identische Aminosäuren (Sköld, 2000).

Das *sul3* Gen wurde 2003 von Perreten & Boerlin (2003) auf einem Plasmid entdeckt; es hat im Vergleich mit dem *sul1* Gen auf dem *Escherichia coli*-Plasmid R388 (Sundström *et al.*, 1988) 40,9 % identische Aminosäuresequenz, während es zum *sul2* Gen auf dem *E. coli* Plasmid RSF1010 (Scholz *et al.*, 1989) 40,6 % identische Aminosäuresequenz aufweist. Das *sul3* Gen ist wesentlich weniger abundant in der Umwelt als die *sul1* und *sul2* Gene und wurde deswegen in diesem Projekt nicht untersucht.

Die *sul1* und *sul2* Resistenzgene werden häufig in klinischen Proben von Gram-negativen Bakterien gefunden (Sköld, 2001).

1.3.2 Nachweis von Sulfadiazin-Resistenzgenen in Umweltproben, kultivierungsabhängige Methoden

Der kultivierungsabhängige Nachweis von SDZ- bzw. Antibiotikaresistenzgenen basiert auf der einfachen Methode, die Umweltprobe zu verdünnen und sie auf selektivem antibiotikahaltigem Medium zu plattieren. Die Kolonien, die wachsen, können dann quantifiziert und nach Vereinzelung sowie Anreicherung untersucht werden. Antunes *et al.* (2006) haben so z.B. das *sul3* Gen in Salmonellen aus Umweltproben nachweisen können.

Diese Methode des Plattierens auf selektivem Medium ist allerdings stark limitiert durch die Kultivierbarkeit der Bakterien; es wird geschätzt, dass nur etwa 0,1 % der Umweltbakterien mit bisherigen Methoden kultivierbar sind (Nichols, 2007).

1.3.3 Nachweis von Sulfadiazin-Resistenzgenen in Umweltproben, kultivierungsunabhängige Methoden

Man kann die Gesamt-DNA einer Umweltprobe extrahieren und mittels Polymerase-Kettenreaktion (engl: polymerase chain reaction, PCR) mit spezifischen Primern Resistenzgene amplifizieren. Als Beispiel haben Chee-Sanford *et al.* (2001) mit dieser Methode Tetracyclin-Resistenzgene im Grundwasser unter einer Schweinefarm detektieren können. Durch eine anschließende Southern Blot-Hybridisierung mit Referenzgenen der amplifizierten Zielgene kann man die Sensitivität der Detektion heraufsetzen und gleichzeitig ihre Sequenzspezifität kontrollieren (Smalla *et al.*, 1993). Mittlerweile können Zielgene aus der Gesamt-DNA einer Umweltprobe mit der quantitativen Real Time PCR (qPCR) quantifiziert werden. So konnten Heuer & Smalla (2007) die signifikante Erhöhung der *sul1* Genabundanz in Boden, der mit SDZ-belasteter Gülle inokuliert wurde, quantifizieren (Heuer & Smalla, 2007). Setzt man die Anzahl der Zielgene in Korrelation zu den 16S Kopienzahlen, erhält man die relative Abundanz der Zielgene in einer bakteriellen Gemeinschaft, ein wichtiges Werkzeug zur Erforschung der Ökologie von z.B. Plasmiden oder Antibiotikaresistenzgenen in bakteriellen Gemeinschaften.

Die Analyse der Gesamt-DNA einer Umweltprobe durch PCR-Amplifikation ist limitiert durch die verfügbaren Primersequenzen. Nicht bekannte sowie in der Primersequenz mutierte Resistenzgene können nicht detektiert werden. Weiterhin geht bei diesem Ansatz jegliche phylogenetische Information über den Träger der Resistenzgene verloren. Hinzu kommt, dass die Effektivität der Zelllyse und DNA-Extraktion durch die Zellmorphologie sowie durch die physiko-chemischen

Eigenschaften des Bodens wie z.B. den Tongehalt beeinflusst wird (Lombard *et al.*, 2011).

Eine weitere Methode zur Detektion von transferablen Antibiotikaresistenzgenen ist die exogene Plasmidisolierung (Abbildung 5). Diese Methode nutzt die Fähigkeit von Plasmiden der bakteriellen Fraktion einer Umweltprobe zur Konjugation oder Mobilisierung und ermöglicht das von der Kultivierbarkeit des ursprünglichen Wirts unabhängige Isolieren von Plasmiden in einen bekannten Rezipienten. Die bakterielle Fraktion einer Umweltprobe wird extrahiert und über Nacht auf einem selektionsfreien, nährstoffhaltigen Medium mit dem Rezipienten inkubiert. Der Rezipient muss selektierbar sein, z.B. durch eine oder mehrere chromosomal codierte Antibiotikaresistenzen - in unserem Fall waren das eine Rifampicin- und eine Kanamycin-Resistenz - sowie sensitiv gegenüber dem Antibiotikum sein, auf dessen Resistenz überprüft wird, und einen bekannten genetischen Hintergrund besitzen. Anschließend wird eine serielle Verdünnung, die Bakteriensuspension (Donoren und Rezipienten), auf einem selektiven Medium ausgestrichen, das das Antibiotikum, nach dessen Resistenz gesucht wird, enthält. Die GFP-fluoreszierenden Bakterien, die auf dem selektiven Medium wachsen, haben aus der Umweltprobe ein plasmidkodiertes Resistenzgen aufgenommen, das man nun isolieren und untersuchen kann. Diese Methode wird „biparental mating“ genannt und wurde erstmals von Bale *et al.* (1988) beschrieben.

Das „triparental mating“ wurde erstmals von Hill *et al.* (1992) genutzt. Es funktioniert wie das „biparental mating“, allerdings wird dem Donor-Rezipienten-Mix noch ein Bakterium zugegeben. Dieses Bakterium besitzt ein nicht selbsttransferierbares Plasmid, das über plasmidmobilisierende Gene (*mob*) verfügt. Dadurch kann man die Mobilisierungsfrequenz von Umweltplasmiden aus einer bakteriellen Fraktion erhöhen (Abbildung 5) und nicht selbsttransferierbare Umweltplasmide mobilisieren.

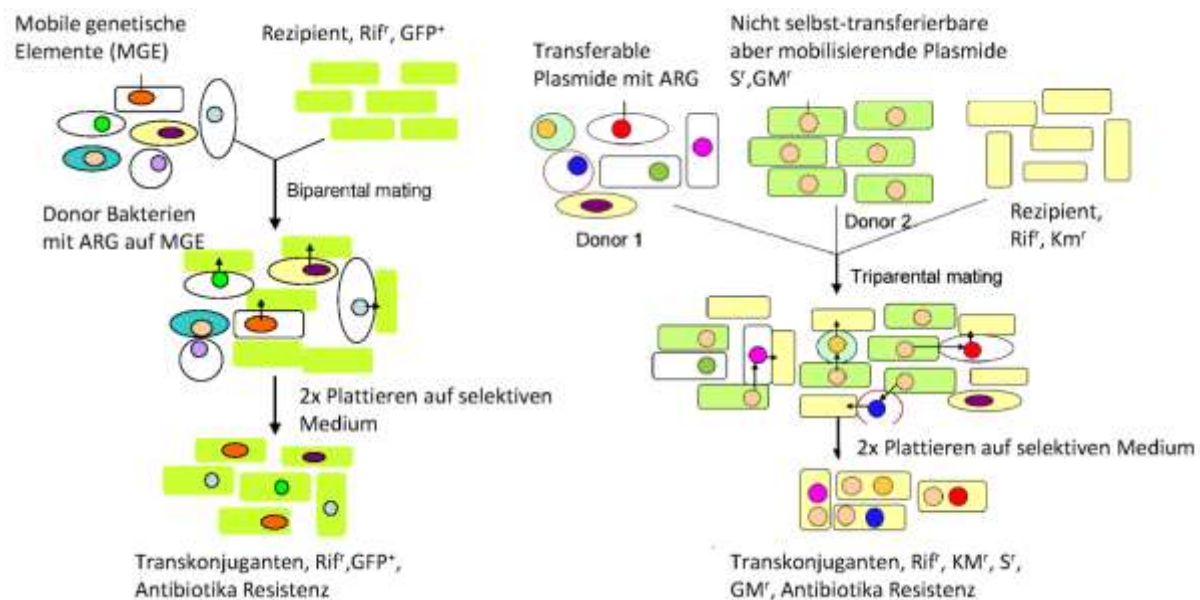


Abbildung 5: Schema vom Biparental- und Triparental-Mating

ARG: Antibiotikaresistenzgen, GFP: Grün fluoreszierendes Protein, Rif: Rifampicin, S: Streptomycin, GM: Gentamicin, Km: Kanamycin.

Mit dieser Methode können Plasmide aus Umweltproben gewonnen werden. Dabei wird das Problem der fehlenden Kultivierbarkeit der plasmidtragenden Umweltbakterien umgangen. Diese Methode hat allerdings einige Limitierungen; so geht die Information über den jeweiligen Wirt verloren, und ihre Effizienz ist stark abhängig von den Versuchsbedingungen (Dauer, Medium, Temperatur). Des Weiteren hat diese Methode bis jetzt nur mit Gram-negativen Proteobakterien als Rezipienten funktioniert (Smalla & Sobecky, 2002), was den Kreis der zu fischenden Plasmide erheblich einschränkt (siehe 1.2.3 und 1.2.4).

Mit der exogenen Plasmidisolierung konnten jedoch schon erfolgreich Antibiotikaresistenz vermittelnde Plasmide aus verschiedenen Umweltproben isoliert werden, z.B. aus Boden (Jechalke *et al.*, 2013c), aus der Rhizosphäre (van Elsas *et al.*, 1998), aus Kläranlagen (Schlüter *et al.*, 2007) und aus Gülle (Smalla *et al.*, 2000, van Overbeek *et al.*, 2002, Binh *et al.*, 2007).

1.4 Zielsetzung der Arbeit

In dieser Arbeit wurden die Effekte von SDZ-belasteter Schweinegülle auf die Abundanz und Transferabilität von SDZ-Resistenzgenen in bakteriellen Bodengemeinschaften durch Nutzung kultivierungsunabhängiger Methoden (qPCR, exogene Plasmidisolierung) untersucht. Fragestellungen und Ziele der Arbeit waren:

- I. Werden die Effekte von SDZ-belasteter Gülle auf die Abundanz und Transferabilität von SDZ-Resistenzgenen im Boden beeinflusst von der Rhizosphäre?
- II. Wie sind die Effekte des Pflanzenwachstums (Mais- und Gras-rhizosphäre) auf die Abundanz und Transferabilität von Resistenzgenen in bakteriellen Bodengemeinschaften in Abhängigkeit vom Verbleib des SDZ und seiner Metabolite? Sind diese Rhizosphäre-effekte pflanzenspezifisch? Wie werden diese Effekte durch wiederholte Gülleapplikation im Feldversuch beeinflusst?
- III. Eine räumliche Auflösung der Dynamik des SDZ und seiner Metabolite, Resistenzgene, Resistenzplasmide und ihrer Wirte in Abhängigkeit vom Abstand zur Rhizosphäre darzustellen.
- IV. Um die Entwicklung von quantitativen Werkzeugen zur Plasmidökologie zu ermöglichen, sollen die Wirte der resistenzvermittelnden Plasmide im Boden und in der Gülle isoliert sowie taxonomisch identifiziert werden.
- V. Überleben die aus der Gülle kommenden Wirte im Boden, wird das Überleben von aus Gülle stammenden Populationen durch die Pflanze unterstützt?
- VI. Wie beeinflussen die resistenzvermittelnden Plasmide die Fitness ihrer Wirte im Boden, im begüllten Boden und in der Rhizosphäre?

2 Material und Methoden

2.1 Experimentelle Designs

2.1.1 Experimentelles Design Mesokosmos

Zur Produktion der Gülle wurde den Schweinen eine intramuskuläre Injektion mit der für SDZ vorgeschriebenen Dosis von 30 mg/kg Körpergewicht an vier aufeinanderfolgenden Tagen verabreicht und die Gülle an den folgenden 10 Tagen gesammelt. Die verabreichte SDZ-Lösung (200 mg/ml) wurde freundlicherweise von Vetoquinol Biow (Gorzow Wielgopolski, Polen) zur Verfügung gestellt. Die Kontrollgülle stammte von Schweinen, die keinen Kontakt zu Antibiotika hatten. Der für alle Experimente verwendete Oberflächenboden war ein Luvisol aus Merzenhausen (Deutschland) mit 1,2 % organischem Kohlenstoffgehalt, einem pH-Wert (CaCl_2) von 6,3, einer Kationen-Austausch-Kapazität von 11,4 cmol/kg (gemessen bei einem pH-Wert von 8,1), 16 % Tongehalt ($<2\mu\text{m}$), 78 % Lehmgehalt (2-64 μm) und 6 % Sand (63-2000 μm). Die Gülle mit 90,2 % und 87,8 % Feuchtgehalt (w/fw = Gewicht/Frischgewicht) für die antibiotikafreie Gülle und die SDZ-belastete Gülle sowie der Boden (ca. 15 % Restfeuchte) wurden intensiv maschinell und mit einem Bagger im Verhältnis 1:25 (w/dw = Gewicht/Trockengewicht) gemischt und in Polystyrol-Behälter (140 x 80 x 40 cm, $n=4$) gefüllt, die am Tag darauf mit Mais besät wurden.



Bild 1: Versuchsaufbau; zu sehen sind die Polystyrol-Behälter der einzelnen Behandlungen und Replikate mit bereits gewachsenen Maispflanzen

Die Verteilung der Gülle in den Behältern wurde nicht bestimmt, allerdings wurden immer Mischproben genommen, um die potentielle nicht homogene Gülleverteilung auszugleichen. Die Temperatur wurde während der Inkubation konstant auf 21°C gehalten; die Pflanzen wurden mit zwei Halogenstrahlern (je 400 Watt) und einem Tag-/Nacht-Zyklus von 16:8 Stunden beleuchtet. Die Bodenfeuchte variierte zwischen 8,5 und 15,2 % ($w/dw = \text{Gewicht/Trockengewicht}$), der Wasserverlust wurde regelmäßig durch Bewässerung ausgeglichen. Zur Bestimmung der Konzentration von SDZ und seinen Metaboliten wurden an den Tagen 0, 1, 7, 14, 28, 42 und 63 Bodenproben genommen. Der nicht durchwurzelte Boden wurde mit einem Stechzylinder (9,2 cm hoch x 1,2 cm innerer Durchmesser) zwischen den Maisreihen aus fünf Einzelproben beprobt (siehe Bild 2).



Bild 2: Die Beprobung des nicht durchwurzelten Bodens

Die Beprobung der Maisrhizosphäre war vor Tag 14 nicht möglich, da die Wurzeln noch nicht ausreichend gewachsen waren. Die Rhizosphärenproben wurden von vier Maispflanzen gewonnen und definiert als Boden, der nach dem Ausgraben und sachtem Schütteln an den Wurzeln haften blieb (siehe Bild 3).



Bild 3: Die Beprobung der Maisrhizosphäre

Es muss erwähnt werden, dass zu den hoch sensitiven molekularbiologischen Untersuchungen eine rigorosere Methode der Rhizosphärenprobenerstellung genutzt wurde als zur SDZ-Konzentrationsbestimmung, da hierfür eine Menge von mindestens 10 g Boden benötigt wurde. Die Ergebnisse der DNA-basierten Untersuchungen beziehen sich auf den an den Wurzeln haftendem Boden, der nach heftigem Schütteln haften blieb.

2.1.2 Experimentelles Design Feldversuch

Die Gras- und Maisflächen (3 x 6 m, n = 4) des Feldexperiments wurden zufällig angeordnet auf einem Feld mit Luvisol-Boden in der Nähe von Jülich (Rosendahl *et al.*, 2011). Das Experiment wurde von Mai 2009 bis Juni 2010 durchgeführt. Die Lufttemperatur sowie der Niederschlag wurden von einer Wetterstation

aufgezeichnet und von Rosendahl *et al.* (2011) veröffentlicht. Die Gülle wurde in einer Konzentration von 30 m³/ha mit modifizierten Gießkannen am 19. Mai 2009 (Tag 0) ausgebracht. Sie wurde per Bodenfräse bis in 12 cm Tiefe vor der Aussaat des Mais (*Zea mays* L.) in die Flächen eingearbeitet, während sie auf den Grasflächen nicht in den Boden eingearbeitet wurde, da die Graspflanzen schon gewachsen waren. Während dieser und den folgenden Gülleapplikationen dauerte die Oberflächenausbringung der Gülle auf den Grasflächen maximal eine Stunde, abhängig von den vorherrschenden Wetterbedingungen. Die Penetrationstiefe der Gülle auf den Grasflächen wurde nicht ermittelt, und so wurden die Probenahmen auf die oberen vier cm der Grasflächen beschränkt. Die Flächen waren bewachsen mit einer Mischung aus 47 % *Lolium perenne* L., 20 % *Festuca pratense* L., 10 % *Poa pratensis* L. und 6 % *Trifolium repens* L. und stellte damit eine typische dauerhafte Weideland-Mischung dar. Die Graslandflächen wurden zwei Monate vor dem Start des Experimentes ausgesät. Gemäß den deutschen Bestimmungen zur Ausbringung von Gülle auf landwirtschaftlich genutzten Flächen, die den jährlichen Eintrag von Stickstoff auf 170 kg/ha/Jahr limitieren (Anonymus, 2007), wurde die Menge der ausgebrachten Gülle bei der zweiten und dritten Gülleapplikation reduziert. Die zweite Gülleapplikation (10 m³/ha) zwischen den Maisreihen und auf den gemähten Grasflächen erfolgte am 7. Juli (Tag 49), gefolgt von der dritten Gülleapplikation am 29. September (Tag 133) - einen Tag, nachdem der Mais geerntet und das Gras gemäht wurde. Nach der dritten Gülleapplikation wurden die Maisflächen wieder mit einer Bodenfräse gemischt. Vor jeder Gülleapplikation wurde die Gülle immer mit derselben Menge Wasser versetzt, um eine homogenere Verteilung der Gülle auf den Flächen zu gewährleisten. Bodenproben wurden an den Tagen 0, 2, 7, 14, 28, 42, 48, 49, 56, 63, 67, 77, 105, 132, 133, 140, 147, 161 und 175 genommen, wie in Rosendahl *et al.* (2011) beschrieben. Die Rhizosphäre der Maispflanzen war nur zwischen den Tagen 42 bis 132 in ausreichender Menge vorhanden.

2.1.3 Experimentelles Design Mikrokosmos Braunschweig

Im Experiment wurde ein Parabraun-Boden mit einem organischen Kohlenstoffgehalt von 1,2 %, 16 % Lehm, 78 % Schluff und 6 % Sand verwendet. Die Schweinegülle wurde freundlicherweise von Dr. Berk (Johann Heinrich von Thünen-Institut, Braunschweig) zur Verfügung gestellt und stammte von Schweinen, die nie in Kontakt mit Antibiotika standen. Gülle und Boden wurden im Verhältnis 1:25 (Gewicht/Trockengewicht) gemischt.

Der Bakterienstamm *Acinetobacter baylyi* BD413 (Rifampicin- und Kanamycin-resistent, miniTN5::*gfp-nptII*) wurde in einer Übernacht-Flüssigkultur bei 28°C angezogen (fünf ml Luria Bertani Bouillon (LB), (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe), Rifampicin 50 mg/l, Kanamycin 50 mg/l). Ein Milliliter dieser Flüssigkultur wurde in eine frische Flüssigkultur zur Anreicherung übertragen und bei 28°C über Nacht inkubiert. Für den plasmidhaltigen *Acinetobacter baylyi* BD413 (Rifampicin- und Kanamycin-resistent, miniTn5::*gfp-nptII*), pHHV216 (Streptomycin- und Tetracyclin-resistent)-Stamm wurden zusätzlich die beiden selektiven Marker Streptomycin (20 mg/l) und Tetracyclin (20 mg/l) hinzugefügt. Die Bakteriensuspensionen wurden pelletiert (2400 x g, 3 min) und zweimal mit 0,85 % NaCl-Lösung gewaschen, um die Antibiotika zu entfernen. Der plasmidhaltige sowie der plasmidfreie Stamm wurden im Verhältnis 1:1 gemischt und in einer geschätzten Konzentration von 10^6 Zellen pro g Boden in den Boden eingemischt. Bei den SDZ-Ansätzen wurde SDZ in einer Konzentration von 50 mg/kg Boden eingemischt. Pro Ansatz (ohne und mit SDZ) wurden vier Replikate erstellt. Während der Inkubation war die Temperatur konstant bei 16°C. Im Experiment Eins wurden Proben an den Tagen 7, 14, 21 und 28 genommen. Basierend auf diesen Erfahrungen und zur Erstellung eines mathematischen Modells wurde beim zweiten Experiment an den Tagen 2, 4, 8, 10, 15, 25 und 32 beprobt.

2.1.4 Experimentelles Design Wirtssuche

In diesem Versuch wurde der gleiche Boden benutzt wie im Wettbewerbsversuch (siehe Kapitel 2.1.3) und mit der gleichen Menge Schweinegülle gemischt. Der plasmidhaltige *E. coli* J53-Stamm (Rifampicin-resistent) pHHV216 (SDZ-, Streptomycin- und Tetracyclin-Resistenz) wurde über Nacht in fünf ml LB Flüssigkultur (Rifampicin 50 mg/l, Streptomycin 20 mg/l und Tetracyclin 20 mg/l) bei 28°C angezogen. Ein ml dieser Flüssigkultur wurde in eine frische Flüssigkultur (fünf ml LB-Bouillon) mit den gleichen selektiven Markern zur Anreicherung übertragen und bei 28°C über Nacht inkubiert. Die Bakteriensuspension wurde pelletiert (2400 x g, 3 min) und zweimal mit 0,85 % NaCl-Lösung gewaschen, um die Antibiotika zu entfernen. Die Bakteriensuspension wurde in einer geschätzten Konzentration von 10^6 Zellen pro kg Boden eingemischt, der in Polystyrol-Blumentöpfe (acht cm im Durchmesser und acht cm Tiefe) gefüllt und mit bereits angezogenen Maiskeimlingen bepflanzt wurde. Alle zwei Tage wurde gegossen und sechs Wochen bei konstanten 16°C inkubiert.

Zur Rückisolierung der Plasmide in ihren neuen Wirten wurde die bakterielle Fraktion aus dem nicht durchwurzelten Boden sowie der Rhizosphärenfraktion wie oben beschrieben gewonnen.

Anschließend wurde eine serielle Verdünnung der Bakteriensuspension auf Müller-Hinton-Agar nach CLSI (SDZ 100 mg/l, Streptomycin 20 mg/l und Tetracyclin 20 mg/l) ausplattiert und für zwei Tage bei 28°C inkubiert. Pro Ansatz (Kontrollboden unbehandelt, Gülle, nicht durchwurzelter Boden und Rhizosphärenfraktion) wurden 56 mögliche Transkonjuganten gepickt, vereinzelt, in Flüssigkulturen angereichert und auf das Vorhandensein von Plasmiden überprüft. Aus den 56 möglichen Transkonjuganten wurde die genomische DNA mit dem Silica Bead DNA Extraction Kit von Fermentas (Fermentas GmbH, St. Leon Roth) entsprechend den Herstellerangaben extrahiert und anschließend wurden mit der BOX-PCR (Versalovic *et al.*, 1998) Box-Fingerabdrücke erstellt. Des weiteren wurde die Plasmidhaltigkeit der Isolate per Dot- und Southern Blot-Technik (siehe oben) untersucht. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde eine Auswahl von 15 möglichen Transkonjuganten zur weiteren Analyse vorgenommen. Dazu wurde die 16S rRNA Region dieser Isolate amplifiziert, aufgereinigt und zur Sequenzanalyse eingeschickt, um anschließend die Identität der möglichen Transkonjuganten durch einen NCBI Datenbankabgleich (BLAST) zu bestimmen.

2.2 Gülleherstellung für den Feldversuch

Die Gülle wurde im Forschungsbetrieb Frankenhorst (Universität Bonn) produziert, der rund 100 Muttersauen und ihre Nachkommenschaft zu wissenschaftlichen Zwecken beherbergt. Die Mastschweine (Pietrain x deutsche Landrasse, Pietrain x Duroc), die die Gülle produzierten, wurden im frühen Alter (≥ 10 Tage) mit Eisen und Impfstoffen gegen Lungenentzündung (enzootische Pneumonia) behandelt, erfuhren danach aber keinerlei weitere Behandlung mit pharmazeutischen Produkten. Während des Experiments wurden die Schweine mit einer Futtermischung aus Weizen (46 %), Gerste (29,5 %), Soja (2 %), Sojabohnenmehl (20%) und Mineralfutter (2,5 %) gemästet.

Für den SDZ-Ansatz wurden für jede Gülleapplikation die Schweine mit der vorgeschriebenen Dosis von 30 mg/kg Körpergewicht separat via intramuskulärer Injektion an vier aufeinander folgenden Tagen behandelt, ihre Fäkalien wurden an den zehn darauf folgenden Tagen gesammelt (SDZ-Gülle). Die verabreichte SDZ-Lösung (200 mg/ml) wurde freundlicherweise gestellt von Vetoquinol Biow (Gorzow Wielgopolski, Polen). Für den Kontrollansatz wurde zeitgleich Gülle von

unbehandelten Schweinen in einem separaten Behälter gesammelt. Bis zur Applikation der Gülle wurde sie in Plastikfässern bei Umgebungstemperatur gelagert. Grundlegende Gülleeigenschaften variierten zwischen den Behandlungen und den einzelnen Applikationen (z.B. 2,6 bis 8,8 % Trockenanteil, 3,5 bis 6,2 kg N/m³). Die SDZ-Konzentration (durchschnittlich \pm Standardfehler von fünf technischen Replikaten) in der Gülle war 30 ± 2 , 131 ± 12 und 82 ± 13 mg/kg (Frischgewicht) für die Gülleapplikationen 1, 2 und 3 (Rosendahl *et al.* 2011). Zusätzlich enthielten die SDZ-Güllen 19 ± 0 (1. Applikation), $52,0 \pm 2$ (2. Applikation), 32 ± 2 (3. Applikation) mg/kg des SDZ-Metaboliten N-Acetyl-SDZ, der im Boden schnell wieder in SDZ transformiert wird. Die Kontrollgülle enthielt kein SDZ.

2.3 Extraktion der Antibiotika

Die Extraktion der Antibiotika und ihre Konzentrationsbestimmung wurden von der Universität Bonn durchgeführt (Rosendahl *et al.*, 2011).

Um die Antibiotikafractionen mit unterschiedlichen Bindungsstärken und Bioverfügbarkeiten aus dem Boden zu gewinnen, wurden die Antibiotika in verschiedenen Schritten extrahiert wie von Förster *et al.* (2009) beschrieben. Kurz zusammengefasst: Einer Schüttelextraktion (24 Stunden) mit 0,01 M CaCl₂ Lösung folgte eine Methanol-Extraktion (vier Stunden) und letzten Endes eine erschöpfende Acetonitril : Wasser (20:80, v/v) Mikrowellenextraktion. SDZ und seine Hauptmetabolite 4-OH-SDZ und N-Ac-SDZ wurden in den Extrakten via LC/MS-MS analysiert.

Details dieser Analyseprotokolle wurden in Rosendahl *et al.* (2011) veröffentlicht. Die Konzentrationen der CaCl₂- und Methanol-Fraktion wurden zusammengefasst und als EAS bezeichnet (EAS = easily extractable fraction, einfach zu extrahierende Fraktion) und dienten als Schätzung für bioverfügbare SDZ-Konzentrationen. Die Mikrowellen-Extraktionsausbeute stellt das stark gebundene SDZ dar, RES (Residual Fraktion).

2.4 DNA-Extraktion und denaturierende Gradientengelelektrophorese (DGGE) von amplifizierten 16S-Genfragmenten aus Gemeinschafts-DNA

Die DNA wurde aus 0,5 g vom nicht durchwurzelten Boden, der Rhizosphäre und den Güllen mit dem Fast DNA Spin Kit for soil (entsprechend der Anleitung des Herstellers, MP Biomedicals, Heidelberg) extrahiert, darauf folgte ein Aufreinigungsschritt mit dem Geneclean Spin Kit (entsprechend der Anleitung des Herstellers, MP Biomedicals, Heidelberg).

Die Amplifikation der 16S rRNA Genfragmente der Bakterien aus der Gesamt-DNA aus den Boden-, Rhizosphäre- und Gülleproben sowie die Separierung der PCR-Fragmente in der DGGE wurde durchgeführt wie in Weinert *et al.* (2009) beschrieben. Nach dem Alignment wurde eine Pearson-Korrelation mit dem Programm GelCompar II (Version 6.5, Applied Maths, Austin, Texas, USA) durchgeführt. Die Ähnlichkeitsmatrix wurde benutzt, um behandlungsabhängige Effekte einem Signifikanztest zu unterziehen und die Unterschiede zwischen den bakteriellen Gemeinschaften nach Kropf *et al.* (2004) zu bestimmen.

2.5 Detektion und Quantifizierung der Zielgene

Die Genkopiezahlen wurden mit der Real Time PCR 5' nuklease Assay im CFX96TM Real Time PCR Detection System (Bio-Rad, Hercules, Kalifornien, USA) quantifiziert, wie für *sul1*, *sul2*, bakterielle 16S rRNA Gene (*rrn*) und *traN* in Heuer & Smalla (2007) und Heuer *et al.* (2009) beschrieben. Um die unterschiedlichen DNA-Extraktions- und Amplifikationseffizienzen der einzelnen Proben auszugleichen, wurden die relativen Genabundanz als Quotient aus Zielgen-Kopiezahlen (*sul1*, *sul2*, *traN*) und *rrn*-Kopienzahlen bestimmt und das Ergebnis wurde log-transformiert. Die *sul3*-Abundanz wurde aufgrund zu geringer Abundanz in diesem Boden und in vielen anderen beschriebenen Gülleproben nicht bestimmt (Heuer & Smalla, 2007).

$\text{Log}(\text{Zielgen}/rrn)$

Formel 1: Relative Genabundanz

2.6 Exogene Plasmid isolation

E. coli K12 CV601 (Rifampicin-resistent, miniTn5::*gfp-nptII*) wurde als Rezipient für die exogene Plasmid isolation genutzt, wie in Heuer *et al.* (2002) beschrieben. Der Rezipientenstamm wurde in fünf ml Luria Bertani (LB)-Bouillon (Carl Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe) mit Kanamycin und Rifampicin (beide 50 mg/l) bei 28°C über Nacht im Schüttler angezogen. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (4880 x g, 5 min.) geerntet und zweimal mit 0,85 % NaCl Lösung gewaschen. Das Zellpellet wurde in 2,5 ml LB-Bouillon resuspendiert. Zur Bestimmung der Rezipientenzahl wurde von dieser Suspension eine Verdünnungsreihe erstellt und die Zellzahlen wurden per Tüpfeltest ermittelt. Ein Gramm nicht durchwurzelter Boden bzw. Rhizosphäre von den Tagen 28, 42 und 63 wurde resuspendiert in neun ml Sojabouillon (1:10 verdünnt; Soy Broth, Becton Dickinson GmbH, Heidelberg), mit fünf sterilen Glasperlen (vier mm Durchmesser) versetzt und für zwei Stunden im

Überkopf-Schüttler (GFL 3025, Braunschweiger Labor Bedarf, Braunschweig) inkubiert. Vier ml der jeweiligen Bodenlösung (nicht durchwurzelter Boden und Rhizosphäre) wurden in ein neues Gefäß überführt und 1 ml der Rezipientenlösung wurde zugegeben. Als Kontrolle dienten beide Bodenlösungen jeweils ohne Rezipientenlösung. Die Lösungen wurden zentrifugiert ($4880 \times g$, 5 min.) und das Pellet wurde in 100 μ l LB-Bouillon resuspendiert und jeweils auf einen sterilen Filter pipettiert (Porengröße 22 μ m, Millipore, Billerica, Massachusetts, USA), der auf einer mit Cycloheximid (100 mg/l) versehenen Plate Count Agar-Platte (PCA, Merck KGaA, Darmstadt) platziert war. Die Filter wurden über Nacht bei 28°C inkubiert. Der Zellrasen wurde in 10 ml 0,85% NaCl-Lösung resuspendiert, es wurde eine 10 fache Verdünnungsreihe erstellt und diese mit einem sterilen Drigalskispatel auf Mueller-Hinton Agar (Merck, KGaA, Darmstadt), das mit Kanamycin (50 mg/l), Rifampicin (50 mg/l), SDZ (50 mg/l) und Cycloheximid (100 mg/l) versehen war, plattiert. Die Kontrollen wurden unverdünnt auf das Selektivmedium plattiert. Nach zwei Tagen Inkubation bei 28°C wurden die gewachsenen Kolonien auf Fluoreszenz überprüft, auf frisches Selektivmedium übertragen und als Transkonjuganten weitergeführt. Die Transferfrequenz (TF) wurde als Quotientenanzahl der Transkonjuganten durch die Anzahl der Rezipienten ermittelt.

$TF = \text{CFU/ml Transkonjuganten} / \text{CFU/ml Rezipienten}$

Formel 2: Transferfrequenz

2.7 Plasmidextraktion

Die Plasmide der Transkonjuganten wurden mit dem Qiagen Plasmid Purification Kit (Qiagen, Hilden) entsprechend den Herstellerangaben zur Extraktion von Plasmiden über 50 kb extrahiert. Zum Entsalzen der DNA wurde eine Ultrazentrifugation mit Microcon YM-100 Filter Tubes (Millipore, Bedford, Massachusetts, USA) statt der Alkoholpräzipitation durchgeführt.

2.8 Charakterisierung der extrahierten Plasmide

Die extrahierten Plasmide wurden einem Doppelverdau mit den Enzymen BstZ171 und Pst1 (Fermentas GmbH, St. Leon Rot) entsprechend den Herstellerangaben unterzogen. Die Antibiotikaresistenzprofile wurden vom Robert Koch-Institut (Wernigerode) nach der DIN 58940 (Deutsches Institut zur Normierung, Berlin) von 10 Transkonjuganten mit für die verschiedenen Restriktionsprofile repräsentativen Plasmiden erstellt. Die aus den Transkonjuganten gewonnenen Plasmide wurden mit

der Dot Blot- und Southern Blot-Technik nach dem Standardprotokoll (Sambrook *et al.*, 1989) charakterisiert. Die Dot- und Southern-geblottete DNA wurde mit Digoxigenin-Sonden entsprechend den Angaben des Herstellers (Roche Diagnostics, Mannheim) hybridisiert. Die Sonden *traN* und *repB* („Low GC-Plasmid“) wurden aus PCR-Produkten von dem Plasmiden pHV216 generiert, die in Heuer *et al.* (Heuer *et al.*, 2009, Heuer *et al.*, 2012a) beschrieben wurden. Die Sonden für *sul1* und *sul2* wurden aus den Plasmiden R388 und RSF1010 (Heuer & Smalla, 2007) generiert. Chemilumineszenz wurde mit dem LAS-3000 Luminescent image analyzer (Fujifilm, Düsseldorf) detektiert.

2.9 Statistische Analysen

Die Unterschiede der Transferfrequenzen wurden mit einem paarweisen Vergleich mit dem Tukey Test ($P < 0,05$, SAS 9.2, SAS Institute Inc., Cary, North Carolina, USA) getestet. Zur Kalkulation des SDZ-Gülleeffektes über die Zeit (E) wurden die Unterschiede der relativen *sul1*- und *sul2*-Abundanzen zwischen der Kontrolle und der SDZ-Behandlung für jeden Zeitpunkt wie folgt berechnet:

$$E = \log (sul1/rn + sul2/rn)_{SDZ} - \log (sul1/rn + sul2/rn)_{Kontrolle}$$

Formel 3: Kalkulation des SDZ-Effektes auf die relativen *sul*-Abundanzen über die Zeit

Zu diesem Zweck wurden die relativen *sul*-Abundanzen für jeden Zeitpunkt geordnet nach der Behandlung und nach der Größe.

Die relativen *sul*-Abundanzen wurden gegen die Tage zur vorangegangenen Begüllung aufgetragen und die Korrelation per linearer Regressionsanalyse getestet ($P < 0,05$, SAS 9.2, SAS Institute Inc., Cary, North Carolina, USA).

Zur Evaluierung des Einflusses der Faktoren Zeit, Behandlung und Kompartiment für die relativen *sul1*- und *sul2*-Abundanzen wurde eine dreifaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) mit der MIXED Prozedur von SAS 9.2 (SAS Institute Inc., Cary, North Carolina, USA) berechnet.

2.10 Abundanz des *A. baylyi* BD413 und Anteil der plasmidhaltigen Zellen

Der Boden in den Polystyrol-Töpfen wurde homogenisiert, ein Gramm Boden wurde in neun ml 1:10 verdünnter Sojabouillon (Lauf 1: Merck KGaA, Darmstadt) oder im Lauf 2 in neun ml 0,85 % NaCl-Lösung mit sterilen Glaskugeln (vier mm im Durchmesser) für zwei Stunden im Überkopfschüttler inkubiert (GFL 3025,

Braunschweiger Laborbedarf, Braunschweig). Der nach kräftigem Schütteln an der Wurzel haftende Boden ist als Rhizosphäre definiert. Eine Mischprobe von fünf Gramm Maiswurzeln mit anhaftendem Boden wurde dreimal mit 15 ml 0,85% NaCl-Lösung für 30 s bei hoher Geschwindigkeit gestomachert (Stomacher 400 Laboratory Blender, Searsville, UK). Die Überstände wurden in einem 50 ml Falcon Tube gesammelt. Die Rhizosphärenüberstände wurden zentrifugiert ($3785 \times g$, 15 min, Biofuge Stratos, Heraeus, Hanau) und die Pellets homogenisiert. Es wurde eine Verdünnungsreihe bis 10^{-4} -Verdünnung erstellt und 100 μ l jeder Verdünnungsstufe wurden im Doppelansatz auf LB-Agarplatten (Rifampicin 50 mg/l, Kanamycin 50 mg/l und Cycloheximid 100 mg/l) plattiert und für 48 h bei 28°C inkubiert. Grün fluoreszierende Isolate wurden zur Bestimmung der *Acinetobacter*-Abundanz unter dem UV-Licht gezählt. Von jedem Replikat wurden 50 Kolonien (200 pro Ansatz) mit einem sterilen Zahnstocher gepickt und auf LB-Agarplatten (Rifampicin 50 mg/l, Kanamycin 50 mg/l, Streptomycin 20 mg/l, Tetracyclin 20 mg/l und Cycloheximid 100 mg/l) sowie LB-Agarplatten ohne selektiven Marker als Lebendkontrolle übertragen und für 24 h bei 28°C inkubiert. Die auf den selektiven Medium gewachsenen grün fluoreszierenden Isolate wurden zur Bestimmung der plasmidhaltigen *Acinetobacter* im Boden gezählt.

Zur Berechnung der Selektionskoeffizienten setzten wir voraus, dass der Nettoeffekt von Wachstums- und Sterbeprozessen in dieser Studie während der ersten 15 Tage der Wiederholung des Experiments auf einem ähnlichen Niveau blieb. Folglich wurden die Steigungen der linearen Regressionen basierend auf den BD413-Zellzahlen der ersten 15 Tage dividiert durch die initiale BD413-Zellzahl am Tag 0 errechnet. Die Zellzahlen am Tag 0 im Boden ergaben sich aus den mit der Gülle eingebrachten Startinokula. Diese geschätzten Zahlen berücksichtigen nicht die Wiederfindungsrate der *A. baylyi*-Populationen aus dem Boden nach der Gülleapplikation, sollten aber einen Vergleich zwischen den Behandlungen (SDZ-Gülle und Kontrollgülle) erlauben, da das Startinokulum dieselbe Anzahl an Zellen hatte. Um herauszufinden, ob derselbe Trend im ersten Lauf ebenfalls zu beobachten war, wurden die Steigungen des linearen Regressionsmodells basierend auf den BD413 Zellzahlen von Tag 28 dividiert durch die initiale Zellzahl von Tag 0. Es muss hier erwähnt werden, dass im Gegensatz zu den positiven Wachstumsraten von Lenski *et al.* (1991) in diesem Versuch negative Wachstumsraten verglichen wurden. Daher implizieren hier negative Selektionskoeffizienten, dass die Fitness des Stamms *i* größer ist als die Fitness des Stamms *j* und vice versa.

2.11 Selektionskoeffizient

Der Selektionskoeffizient S_{ij} sowie die konstante Selektionsdruckrate r_{ij} zum Vergleich der Fitness wurden nach Lenski *et al.* (1991) berechnet. Basierend auf dem Verhältnis der Nettowachstumsraten m_i und m_j der plasmidtragenden (*i*) und plasmidfreien Stämme (*j*) wurde der Selektionskoeffizient berechnet.

$$S_{ij} = m_i/m_j - 1$$

Formel 4: Selektionskoeffizient

$$r_{ij} = m_i - m_j = m_j S_{ij}$$

Formel 5: konstante Selektionsdruckrate

2.12 Sequenzierung und Accession Numbers

Die genomische DNA von 15 Transkonjuganten wurde mit dem Silica Bead DNA Extraction Kit von Fermentas (Fermentas GmbH, St. Leon Roth) entsprechend den Herstellerangaben extrahiert, anschließend wurde die 16S rRNA-Region amplifiziert. Die PCR-Produkte wurden aufgereinigt und zur Sequenzierung an die Firma IIT Bielefeld gesendet (IIT Biotech, Universität Bielefeld). Die Sequenzen wurden per `blastx` und `blastn` analysiert (<http://www.blast.ncbi.nlm.nih.gov>) und bei der europäischen Nukleotid-Datenbank (EMBL = European Molecular Biology Laboratory, <http://www.embl.de>) eingereicht, archiviert und mit Accession Numbers versehen (Tabelle 4).

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Abundanz und Transferabilität von Antibiotikaresistenzgenen in Beziehung zu dem Schicksal von Sulfadiazin in der Mais-Rhizosphäre und im nicht durchwurzelten Boden

Abundance and transferability of antibiotic resistance as related to the fate of sulfadiazine in maize rhizosphere and bulk soil

Literaturangabe:

Christoph Kopmann, Sven Jechalke, Ingrid Rosendahl, Joost Groeneweg, Ellen Krögerrecklenfort, Ute Zimmerling, Viola Weichelt, Jan Siemens, Wulf Amelung, Holger Heuer, Kornelia Smalla. 2013. FEMS Microbiology Ecology 83: 125-134

Inhaltsangabe:

In dieser Veröffentlichung wurden die unterschiedlichen Reaktionen der bakteriellen Gemeinschaften in der Maisrhizosphäre und im nicht durchwurzelten Boden auf Selektionsdruck, auf SDZ-belastete Schweinegülle im Vergleich zur Kontrollgülle, in einem Mesokosmosversuch untersucht. Um die Hypothese zu überprüfen, dass die Abundanz und Transferabilität von *sul*-Genen durch die Rhizosphäre positiv beeinflusst wird, wurden die relativen *sul*-Abundanzen und die Transferabilität der *sul*-Gene dieser beiden Kompartimente zu verschiedenen Zeitpunkten untersucht.

3.1.1 Zusammenfassung

In diesem Mesokosmosversuch wurde der Effekt von Gülle SDZ-behandelter Schweine auf die relative *sul*-Genabundanz sowie die Transferabilität der SDZ-Resistenzgene im nicht durchwurzelten Boden und in der Maisrhizosphäre untersucht. Gleichfalls wurden der Verbleib des SDZ im Boden und seine Bioverfügbarkeit gemessen. In der Rhizosphäre nahm die Konzentration des SDZ in der bioverfügbaren Fraktion schneller ab als im nicht durchwurzelten Boden. Gleichzeitig war der HGT in der Rhizosphäre und somit die Transferabilität der *sul*-Resistenzgene erhöht, u.a. vermutlich durch Wurzelexsudation. Die relative Abundanz der *sul*-Resistenzgene war in der Regel in der SDZ-Güllebehandlung signifikant erhöht im Vergleich zu SDZ-freier Güllebehandlung. In der Rhizosphäre war derselbe Trend zu beobachten, der Unterschied war allerdings nicht signifikant.

3.1.2 Verbleib des SDZ und seiner Metabolite im Boden

Von Rosendahl, Siemens, Amelung (Universität Bonn) wurde der Verbleib von SDZ und seinen Metaboliten in der Rhizosphäre und im nicht durchwurzelten Boden untersucht. Als Äquivalent für den bioverfügbaren Teil des SDZ im Boden wurde die EAS-Fraktion untersucht. Nach der Güllezugabe sanken die EAS-Konzentrationen des SDZ und seiner Metabolite 4-OH-SDZ und N-Acetyl (Ac)-SDZ im nicht durchwurzelten Boden schnell ab (Abbildung 6). Angepasste Dissipationsmodelle ergaben für SDZ Dissipationshalbwertszeiten (DT_{50}) von 5,1 Tagen, für das 4-OH-SDZ von 17,6 Tagen und für das N-Ac-SDZ von 0,7 Tagen. In der Residualfraktion (RES, residual fraction) sanken die Konzentrationen des SDZ und seiner Metabolite wesentlich langsamer, es ergaben sich Halbwertszeiten für das SDZ von 85,6 Tagen und für das 4-OH-SDZ von 161,2 Tagen. Interessanterweise wurden kleine Konzentrationen ($< 5 \mu\text{g/kg}$) des SDZ und des 4-OH-SDZ während der gesamten Laufzeit des Experiments in der EAS gemessen - vermutlich als Ergebnis einer Remobilisierung nach fester Bindung an Bodenpartikel aus der RES, wie es von Zarfl *et al.* (2009) bereits beschrieben wurde. Das Risikopotential dieser Langzeitfreisetzung von Antibiotika in subtherapeutischen Konzentrationen ist nicht bekannt.

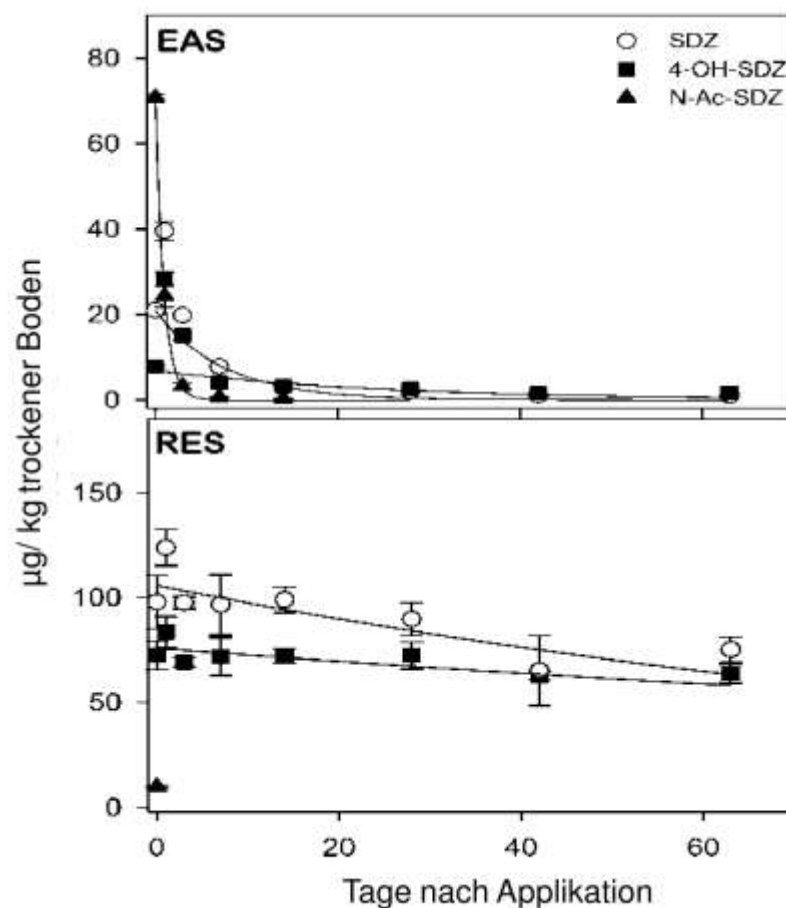


Abbildung 6: Konzentrationen von SDZ, 4-OH-SDZ und N-Ac-SDZ in der EAS- und der RES- Fraktion im nicht durchwurzelten Boden (Durchschnitt aus 4 Replikaten \pm Standardfehler); die Linien zeigen die modellierte Dissipationskurve.

Die EAS- und RES-Konzentrationen des SDZ und des 4-OH-SDZ in der Rhizosphäre sind wesentlich geringer als im nicht durchwurzelten Boden (Abbildung 6). An den Tagen 28 und 63, also an zwei von vier Probenahmen, waren die Konzentrationsunterschiede des SDZ in der EAS signifikant. Am Tag 14 waren die Maispflanzen noch relativ klein, und somit könnte der Rhizosphäreneffekt auf die SDZ-Dissipation schwächer ausgefallen sein als bei den voll entwickelten Maispflanzen am Tag 63. Die Tatsache, dass am Tag 14 nach der Begüllung keine Unterschiede hinsichtlich der SDZ-Konzentration zwischen nicht durchwurzeltem Boden und der Rhizosphäre gemessen wurden, passt zu Studien, die gezeigt haben, dass der Rhizosphäreneffekt Zeit braucht, um sich auszubilden (Hsu & Bartha, 1979, Yu *et al.*, 2003).

Wendet man ein nicht lineares Regressionsmodell zur Berechnung der Dissipationshalbwertszeiten an, sind die DT_{50} für das SDZ in der EAS kleiner in der

Rhizosphäre ($DT_{50} = \ln(2) k^{-1} \pm SE$; $k = 4,0-4,1$ Tage) als im nicht durchwurzelten Boden (4,6-5,8 Tage). Trotz überlappender Fehlerbalken gilt dasselbe für das 4-OH-SDZ ($DT_{50} = 13,1-17,8$ Tage in der Rhizosphäre und 13,9-24,7 Tage im nicht durchwurzelten Boden). Es gab keine detektierbaren signifikanten Unterschiede für die RES ($DT_{50} = 93,6$ Tage für das SDZ und 133,3 Tage für das 4-OH-SDZ). Signifikante Unterschiede in den EAS-SDZ-Bodenkonzentrationen und unterschiedliche Dissipationsraten passen zu den Ergebnissen von Rosendahl *et al.* (2011), die eine beschleunigte Dissipation der einfach zu extrahierenden SDZ-Fraktion im Feldversuch gemessen haben. Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass eine schnellere Dissipation des SDZ in der Rhizosphäre im Vergleich zum nicht durchwurzelten Boden beobachtet wurde.

Beachtet man, dass die Aufnahme der Antibiotika durch die Pflanze generell zu klein ist, um den Verlust des SDZ an der Wurzel zu erklären (Rosendahl *et al.*, 2011), und dass eine erhöhte Aufnahme des SDZ in die RES nicht beobachtet wurde, vermuten wir wie Rosendahl *et al.* (2011), dass die Abnahme des SDZ in der EAS an der Wurzel womöglich durch Abbau durch Mikroorganismen beschleunigt wird. Dieser Effekt könnte im Boden, der dicht an der Wurzel anhaftet und der für unsere DNA-basierten Methoden benutzt wurde, stärker ausgefallen sein.

3.1.3 Effekt von SDZ-belasteter Gülle auf bakterielle Gemeinschaften im nicht durchwurzelten Boden und in der Rhizosphäre

Im Rahmen der hier vorgelegten Promotionsarbeit wurden auf der Basis der vorangegangenen Ergebnisse die Proben der Tage 14 und 63 ausgesucht, um weitere Untersuchungen bezüglich der SDZ-Resistenzgenabundanz und in der Maisrhizosphäre und im nicht durchwurzelten Boden vorkommender Plasmidtypen vorzunehmen (Heuer & Smalla, 2007, Heuer *et al.*, 2008b, Heuer *et al.*, 2009). In diesen Studien wurde der Effekt von SDZ-belasteter und unbelasteter Gülle auf die *sul*-Genabundanz sowie die *traN*-Genabundanz (spezifische Sequenz von „Low GC-Plasmiden“) untersucht. „Low GC-Plasmide“ wurden als weit verbreiteter Vektor für *sul2* in Gülle und güllebehandelten Böden beschrieben (Heuer *et al.*, 2009). Der Effekt des SDZ auf die Rhizosphäre im Vergleich zum nicht durchwurzelten Boden wurde am Tag 63 bestimmt, da dort die Maispflanzen im Mesokosmos-Experiment am weitesten entwickelt waren. Der Gebrauch von Gülle, die von SDZ-behandelten Schweinen stammt, im Vergleich zu SDZ-versetzter Gülle gibt ein realistischeres Bild in Bezug auf die Konzentration des SDZ und seiner Metabolite sowie der

Resistenzgenabundanz in der Gülle wieder. In der Tat waren die relativen *sul1*- und *sul2*-Abundanzen sowie die *traN*-Abundanzen um eine halbe Größenordnung (*sul1*, *sul2*) bzw. um zwei Größenordnungen (*traN*) höher in der SDZ-belasteten Gülle im Vergleich zur Kontrollgülle (-1,6, -1,8, und -1,6 verglichen mit -2,1, -2,3, und 3,6; Werte aus einer Mischprobe). Die Korrelation zwischen Antibiotikagebrauch und Resistenzgenabundanz im Feldversuch wurde schon in folgenden Studien beschrieben: Binh *et al.* (2008) , Binh *et al.* (2010) und Heuer *et al.* (2011a) Heuer *et al.* (2011b). Zusätzlich haben Analysen mittels denaturierender (DGGE) von 16S rRNA-Genfragmenten (*rrn*) aus Gesamt-DNA gezeigt, dass sich die bakterielle Gemeinschaft in ihrer Komposition von SDZ-behandelten und -unbehandelten Schweinen unterscheidet.

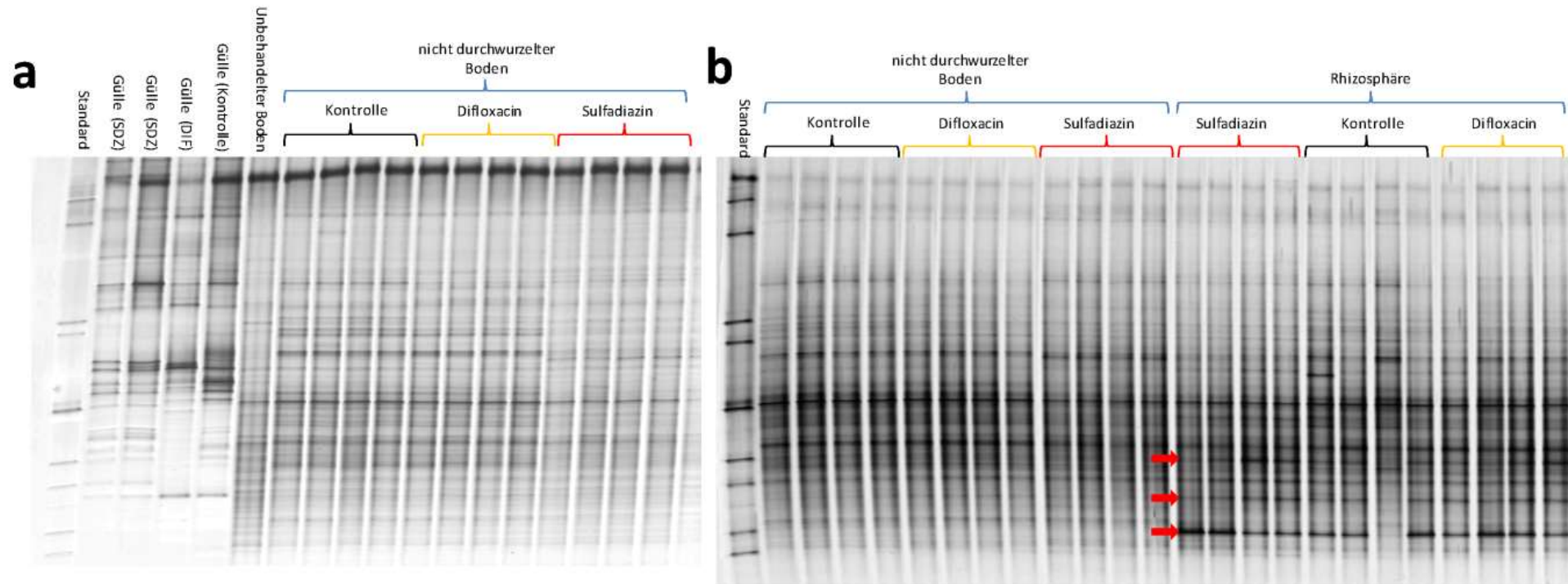


Abbildung 7: Struktur der bakteriellen Gemeinschaft am Tag 63 zwischen den verschiedenen Behandlungen und Kompartimenten, gezeigt durch denaturierende Gradientengelelektrophorese der 16S rRNA-Genfragmente. Die drei Pfeile markieren differenzierende Banden zwischen nicht durchwurzeltem Boden und der Rhizosphäre. Zusätzlich sind hier Daten (nicht Teil dieser Arbeit) aus einem anderen Mesokosmos-Experiment mit Difloxacin aufgetragen.

Zu Versuchsbeginn wurden die relativen Abundanzen von *sul1*, *sul2* und *traN* in einer Mischprobe gemessen und log-transformiert (-5,0, -5,8 und -3,8). Vierzehn Tage nach Zugabe von belasteter und unbelasteter Gülle waren die Abundanzen um eine (*traN*) bzw. um drei Größenordnungen (*sul1*, *sul2*) gestiegen (Abbildung 8), derselbe Trend wurde im selben Boden schon von Heuer & Smalla (2007) und Heuer *et al.* (2009) beobachtet.

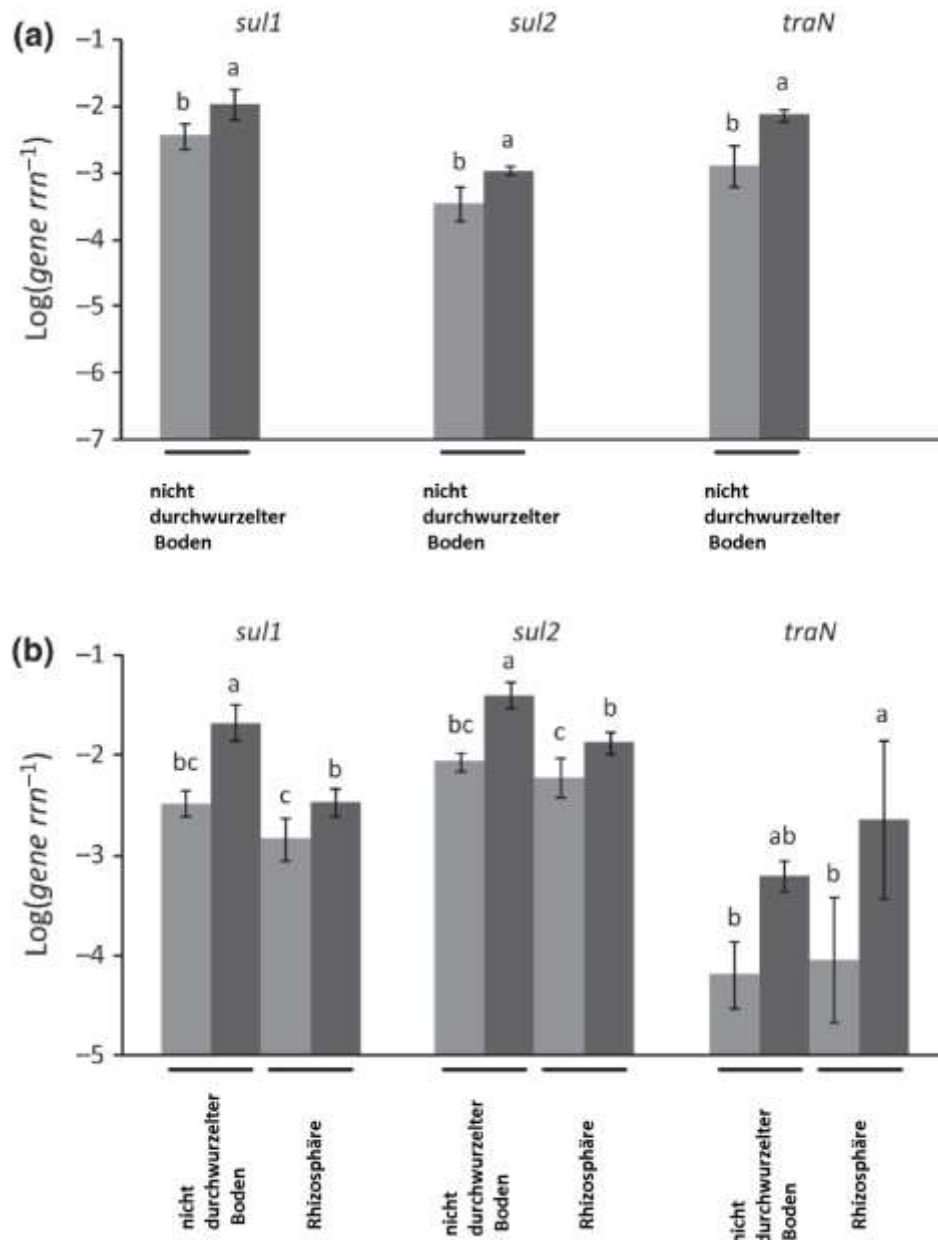


Abbildung 8: Der Effekt von Gülle mit oder ohne SDZ (grau und dunkelgrau) auf die relative Abundanz der Sulfonamidresistenzgene *sul1* und *sul2* und die Abundanz der „Low GC-Plasmide“ (*traN*) relativ zu den *rrn* Genzahlen in nicht durchwurzeltem Boden am Tag 14 (a) und im nicht durchwurzelten Boden sowie der Rhizosphäre von Mais am Tag 63 (b), quantifiziert mit Real Time-PCR. Fehlerbalken zeigen die

Standardabweichung (n=4). Zur Quantifizierung der *traN*-Gene am Tag 63 (SDZ-Ansatz, Rhizosphäre), wurden nur 3 Replikate analysiert. Unterschiedliche Buchstaben zeigen signifikante Effekte des SDZ für jedes Gen an (Tukey Test, $P < 0,05$).

Der Anstieg der relativen *sul*-Abundanzen ist signifikant höher bei der SDZ-belasteten Gülle im Vergleich zur unbelasteten Gülle (Abbildung 8), was durch den selektiven SDZ-Effekt erhöhter *sul*- und *traN*-Abundanzen in den angepassten bakteriellen Gemeinschaften erklärt werden kann.

Der SDZ-Effekt auf die Abundanzen der *sul*- und *traN*-Gene ist ähnlich den Ergebnissen aus Mikrokosmosexperimenten, bei denen SDZ vor Applikation zur Gülle zugegeben wurde und sich die bakteriellen Gemeinschaften nicht unterschieden (Heuer & Smalla, 2007). In dieser Studie wurde noch 63 Tage nach Güllezugabe und bei viel höheren Konzentrationen als in diesem Versuch ein signifikanter SDZ-Effekt auf die *sul*- und *traN*-Abundanzen gemessen.

Die Konzentrationen der EAS-Fraktion von SDZ im nicht durchwurzelter Boden schwankten zwischen 3 und 40 µg/kg bis zum Tag 14. Zwischen Tag 14 und Tag 63 schwankten die SDZ-Konzentrationen in der EAS-Fraktion von 1,6 bis zu 0,2 µg/kg in der Rhizosphäre und zwischen 3 und 1 µg/kg im nicht durchwurzelter Boden (Abbildung 6). Diese Konzentrationen der EAS-Fraktion von SDZ lagen weit unter der Konzentration von 15 mg/kg, welche zuvor als minimale Konzentration von SDZ im Boden beschrieben wurde, die theoretisch noch einen Einfluss auf die Resistenzgenabundanz hat (Heuer *et al.*, 2008b). Zur Konzentrationsbestimmung der EAS-Fraktion von SDZ ist eine relativ große Menge (10 g) Boden notwendig, was zu einer Verdünnung des SDZ-Effekts in der Rhizosphärenfraktion führen könnte, da zwangsläufig nicht durchwurzelter Boden mitgemessen wird, der eine gewisse Distanz zur Wurzeloberfläche hat. Die SDZ-Konzentrationen, die direkten Einfluss auf die bakteriellen Gemeinschaften haben, waren an der Wurzeloberfläche wahrscheinlich noch geringer als hier gemessen. Dennoch wurden mehrfache Effekte auf Bakterien von Antibiotika in subinhibitorischen Konzentrationen beschrieben (Davies *et al.*, 2006). Gullberg *et al.* (2011) konnten zeigen, dass Antibiotika auch selektieren können, wenn die subinhibitorische Konzentration hundertfach unterschritten wurde. Das unterstützt das Ergebnis, wonach die relative *sul2*-Abundanz im nicht durchwurzelter Boden im SDZ-Ansatz am Tag 63 erhöht ist im Vergleich zu Tag 13 (Abbildung 8). Die Differenz der relativen *sul1*-Abundanz war

im Vergleich zwischen dem SDZ-Ansatz und der Kontrolle am Tag 63 signifikant höher als am Tag 14 (t-test, $P < 0,05$). Derselbe Trend wurde auch für die relative *sul2*-Abundanz gemessen. Heuer & Smalla (2007) zeigten, dass SDZ in Konzentrationen im mg/kg-Bereich die relative Abundanz von SDZ-Resistenzgenen über zwei Monate im Vergleich zum Boden mit Kontrollgülle fördert; so weisen die Unterschiede der *sul1*-Abundanzen am Tag 63 wohl auf eine Selektion durch Antibiotika in eher realistischen, subinhibitorischen Konzentrationen hin. Es soll hier erwähnt werden, dass die Verteilung des SDZ im Boden aufgrund der heterogenen Bindung des SDZ an Huminsäuren sowie der heterogenen Einarbeitung der SDZ-Gülle in den Boden (Junge *et al.*, 2011) nicht homogen ist und es somit Bereiche geben kann, in denen die Konzentrationen höher sein könnten als hier gemessen.

Am Tag 63 waren die absoluten Kopiezahlen der *sul1*-, *sul2*- und *traN*-Gene sowie die 16S rRNA-Gene zwischen einer halben und zwei Größenordnungen höher als am Tag 14. Die erhöhten Abundanzen der 16S rRNA-Gene könnten sowohl im Nährstoffeintrag durch die Pflanze und die Gülle als auch im Vorkommen sowie der Vermehrung von Bakterien mit mehr als einem 16S rRNA-Operon begründet sein. Der Vergleich der Zusammensetzung der bakteriellen Gemeinschaft über die DGGE-Analyse der 16S rRNA-Genfragmente zeigte einen signifikanten Unterschied zwischen Tag 14 und Tag 63 nach der Gülleapplikation (Permutationstest nach Kropf *et al.* (2004), $P < 0,05$). Die Unterschiede der beiden Ansätze sind wahrscheinlich durch resistente Bakterienpopulationen bedingt, die entweder durch die Gülle eingetragen wurden oder nach der SDZ-Gülle-Zugabe angereichert worden sind. Die Unterschiede zwischen dem SDZ-Ansatz und dem Kontrollansatz im nicht durchwurzelter Boden sind am Tag 63 größer als am Tag 14 (Unterschiede zwischen den Ansätzen von 14 % und 9 %), was die Theorie der Selektion von resistenten Bakterien und dem Einfluss von bioverfügbarem SDZ in subinhibitorischen Konzentrationen unterstützt.

3.1.4 Relative *sul*-Genabundanz in Bezug auf die SDZ-Konzentration

Basierend auf den Beobachtungen von Brandt *et al.* (2009), dass die Zugabe von künstlichen Wurzelexsudaten die Toleranz von bakteriellen Gemeinschaften gegenüber SDZ erhöht, wurde ein erhöhtes Potential für die Entstehung und Ausbreitung von SDZ-Resistenz an der Wurzel erwartet. Zudem ist die Rhizosphäre auch als „Hot Spot“ für HGT bekannt (Heuer & Smalla, 2012), begründet durch höhere Zelldichten sowie erhöhte relative Abundanzen von bestimmten Populationen

und erhöhte metabolische Aktivität durch Wurzelexsudation. Interessanterweise waren die Unterschiede zwischen dem SDZ-Ansatz und der Kontrolle bezüglich der relativen Abundanz von *sul1* und *sul2* am Tag 63 im nicht durchwurzelten Boden höher als in der Rhizosphäre (t-test, $P < 0,05$). Die kleineren Unterschiede in der Rhizosphäre zwischen dem SDZ- und dem Kontrollansatz sind gut mit der schnelleren Dissipation des SDZ an der Wurzel zu erklären. Ein lineares Regressionsmodell korreliert die relativen *sul*-Abundanzen am Tag 63 mit den geschätzten akkumulierten SDZ-Konzentrationen in der Rhizosphäre und dem nicht durchwurzelten Boden bis zum Tag 63 (Abbildung 9). Allerdings kann nicht ausgeschlossen werden, dass die unterschiedliche Zusammensetzung der bakteriellen Gemeinschaften an der Wurzel und im nicht durchwurzelten Boden die unterschiedlichen Effekte auf die relative *sul*-Genabundanz verursacht hat. Die Ergebnisse der Regressionsanalyse deuten darauf hin, dass die geringeren SDZ-Konzentrationen an der Wurzel verglichen mit dem nicht durchwurzelten Boden zu einem geringeren Selektionsdruck an der Wurzel geführt haben. Dieser geringere Selektionsdruck könnte einen größeren Einfluss auf die relativen *sul*-Abundanzen haben als die erhöhte mikrobiologische Aktivität und die erhöhten Frequenzen des HGT, verursacht durch den Nährstoffeintrag über Wurzelexsudate.

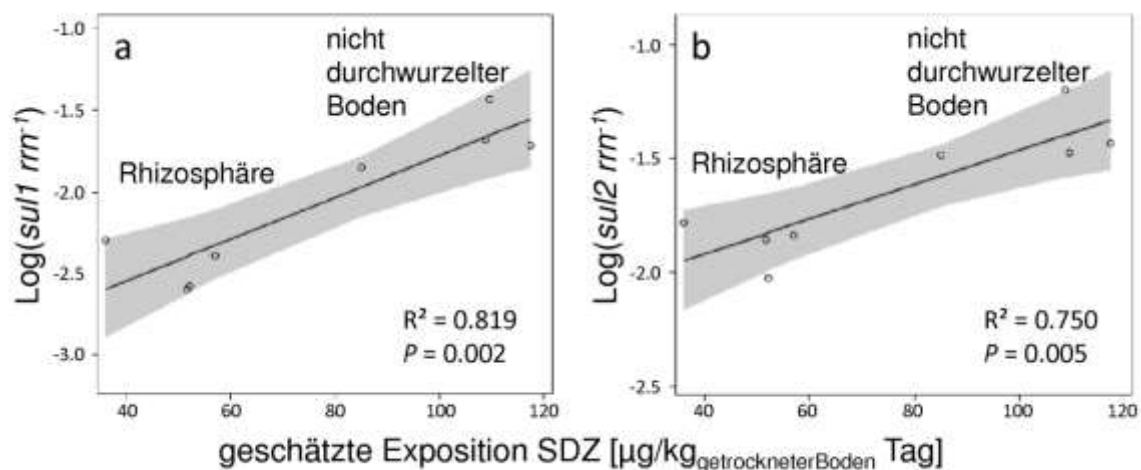


Abbildung 9: Verhältnis zwischen den relativen *sul1*- und *sul2*-Abundanzen mit geschätzten SDZ-Konzentrationen, kalkuliert für den nicht durchwurzelten Boden und die Rhizosphäre am Tag 63. Die geschätzten SDZ-Konzentrationen wurden errechnet durch das Addieren der einfach zu extrahierenden SDZ-Fractionen jeder Probenahme multipliziert mit den Tagen bis zur nächsten Probenahme. Das lineare Regressionsmodell zeigt eine signifikante Beziehung für beide Gene ($P < 0,05$). Der graue Bereich zeigt das 95 % Konfidenzintervall ($n=8$).

3.1.5 Gewinnung und Charakterisierung von Antibiotikaresistenzplasmiden

Die Methode der exogenen Isolierung von mobilen genetischen Elementen, die eine SDZ-Resistenz transferieren, wurde genutzt, um die Effekte von SDZ in Schweinegülle auf die Transferabilität der SDZ-Resistenz zu quantifizieren. Zu diesem Zweck wurden Filtermatings mit Bodenbakterien als Plasmiddonoren und einem *gfp*-markierten Rifampicin-resistenten *E. coli*-Stamm als Rezipienten durchgeführt. *E. coli* wurde sowohl aufgrund seiner Bedeutung in der Humanmedizin als auch wegen seiner Sensitivität gegenüber SDZ als Rezipient ausgewählt. Die Evaluierung der TF am Tag 63 zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen dem SDZ-Ansatz und der Kontrolle im nicht durchwurzelten Boden ($\log(\text{TF}) \pm \text{SD}$ von $-6,3 \pm 0,2$ und $-6,7 \pm 0,3$) und in der Rhizosphäre ($\log(\text{TF}) \pm \text{SD}$ von $-5,9 \pm 0,2$ und $-5,8 \pm 0,5$ Tukey Test, $P < 0,05$). Daher konnte der von Heuer & Smalla (2007) beschriebene signifikante Effekt von SDZ auf die TF bei Konzentrationen zwischen 10-100 mg SDZ/kg Boden hier nicht bestätigt werden. Dennoch konnten in beiden Rhizosphärenansätzen signifikant höhere TF im Vergleich zum nicht durchwurzelten Boden gemessen werden, was die Ergebnisse zur Rhizosphäre als „Hot Spot“ für Plasmidtransfer als Konsequenz von höherer Zelldichte und Zellverteilung, verursacht durch Wurzelexsudation sowie Wurzelwachstum, unterstützt (Molbak *et al.*, 2007). Insgesamt 229 Antibiotikaresistenzplasmide wurden durch exogene Plasmidisolation in *gfp*-markierten Rifampicin-resistenten *E. coli* „gefischt“, und 119 von ihnen wurden per Hybridisierung weiter untersucht.

Behandlung	Kompartiment	Tag 28	Tag 42	Tag 63
Gülle	nicht durchwurzelter Boden	4	9	40(11)
Gülle	Rhizosphäre	4	2	34(16)
Gülle + SDZ	nicht durchwurzelter Boden	5	16	43(16)
Gülle + SDZ	Rhizosphäre	-	15	121(16)
SUMME		13	42	238(64)

Tabelle 1: Anzahl der Transkonjuganten, die an den Versuchstagen 28, 42 und 63 mit der exogenen Plasmidisolation gewonnen wurden. Von den an Tag 63 gewonnenen Transkonjuganten wurden nur 16 pro Bodentyp und Behandlung (Klammern) weiter analysiert. Insgesamt wurden 119 Transkonjuganten weiter untersucht.

Ein großer Teil dieser Plasmide (66 %) wurde als „Low GC-Plasmide“ identifiziert, die die SDZ-Resistenz durch das *su12*-Gen vermitteln, was die wichtige Rolle dieses

Plasmidtyps bei der Verbreitung von SDZ-Resistenzen unterstreicht (Heuer *et al.*, 2009). Am Tag 63 trugen 69 % und 75 % der Transkonjuganten aus dem nicht durchwurzelten Boden bzw. der Rhizosphäre „Low GC-Plasmide“. Die höhere Prozentzahl der gefischten „Low GC-Plasmide“ aus der Rhizosphäre im Vergleich zum nicht durchwurzelten Boden passt zu dem signifikanten Anstieg der relativen Abundanz der *traN*-Gene an der Wurzel im SDZ-Ansatz verglichen mit der Kontrolle, während im nicht durchwurzelten Boden ein signifikanter Anstieg am Tag 14, aber nicht am Tag 63 beobachtet werden konnte (Abbildung 8). Diese Daten lassen eine erhöhte Verbreitung des Plasmids bzw. eine höhere Fitness der plasmidtragenden Bakterien in der Bakteriengemeinschaft der Rhizosphäre auch bei sehr niedrigen Konzentrationen der EAS-Fraktion von SDZ am Tag 63 vermuten. Diese sowie die Ergebnisse anderer Mikrokosmosexperimente legen nahe, dass das „Low GC-Plasmid“ in mit Schweinegülle behandelten Böden weit verbreitet ist (Heuer *et al.*, 2009), wobei erwähnt sein sollte, dass in dieser Studie nur Plasmide gefischt werden konnten, die in *E. coli* transferieren und replizieren können. Das „Low GC-Plasmid“ wurde ebenfalls in 15 Gülleproben aus Gülletanks in Deutschland nachgewiesen (Binh *et al.*, 2008).

Die Analyse der kompletten Sequenzen dreier „Low GC-Plasmide“, die exogen aus mit Gülle behandelten Böden gefischt wurden (Heuer *et al.*, 2009), offenbarte eine konservierte, 30 kbp große „Backbone“-Region, die aus verschiedenen Transfer- und Persistenzmodulen bestand und einen relativ niedrigen GC-Gehalt von 36 % aufwies. Die variable akzessorische Region hatte einen höheren GC-Gehalt und war wesentlich diverser durch verschiedene Antibiotikaresistenzgene, IS (insertion sequence), ein ISCR2 (insertion sequence common region) und Transposon Elemente.

Die Regressionsanalyse konnte keinen signifikanten Zusammenhang zwischen der relativen *traN*-Abundanz und der geschätzten SDZ-Konzentration am Tag 63 in der Rhizosphäre und im nicht durchwurzelten Boden herstellen. Dies ist ein Indiz dafür, dass neben den „Low GC-Plasmiden“ vielleicht auch andere Inkompatibilitätsplasmide bei der Verbreitung der SDZ-Resistenz eine Rolle spielen. Die Antibiotogramme von 10 analysierten Transkonjuganten zeigten eine heterogene Mischung an Resistenzgenen (Tabelle 2) und konnten per „Replicon Typing“ als „Low GC-Plasmide“, IncP-1 ϵ und IncN-Plasmide identifiziert werden. Die 10 untersuchten Transkonjuganten besaßen sechs verschiedene Resistenzprofile mit Resistenzen gegen verschiedene Antibiotikaklassen, z.B. Sulfonamide, Tetracycline

und β -Lactam-Antibiotika. Dies unterstreicht das Risiko für die Humanmedizin durch die Verbreitung der „Low GC-Plasmide“, insbesondere nachdem die Gram-negativen Bakterien *Acinetobacter baylyi* und *E. coli* als potentielle Wirte identifiziert wurden (Heuer *et al.*, 2009), was den Transfer der Resistenzgene in das menschliche Mikrobiom möglich erscheinen lässt.

Gruppe	Antibiotikaresistenz-Profile
1	Sulfamerazin
2	Oxytetracyclin, Sulfamerazin
3	Ampicillin, Ciprofloxacin
4	Chloramphenicol, Oxytetracyclin, Sulfamerazin
5	Chloramphenicol, Oxytetracyclin, Sulfamerazin, Streptomycin
6	Ampicillin, Oxytetracyclin, Sulfamerazin, Streptomycin
7	Chloramphenicol, Oxytetracyclin, Sulfamerazin, Streptomycin, Trimethoprim

zusätzlich zu der SDZ-Resistenz

Tabelle 2: Antibiogramme von Transkonjuganten die ein repräsentatives Plasmid-Restriktionsmuster hatten.

3.1.6 Fazit

Was war bekannt?

Gülle und mit SDZ versetzte Gülle steigern in hohen Konzentrationen die Abundanz und Transferabilität von SDZ-Resistenzgenen innerhalb bakterieller Bodengemeinschaften (Heuer & Smalla, 2007).

Die Rhizosphäre kann die selektive Wirkung von SDZ auf bakterielle Bodengemeinschaften abschwächen.

Die heterogene „Low GC-Plasmidgruppe“ wurde häufig in Gülle und begüllten Böden als resistenzvermittelnde Plasmidgruppe gefunden (Heuer et al., 2009).

Was ist neu?

Gülle von Schweinen, die mit SDZ behandelt wurden, erhöht ebenfalls die Abundanz und Transferabilität von SDZ-Resistenzgenen innerhalb bakterieller Bodengemeinschaften auch bei niedrigeren Konzentrationen.

Die Dissipationsraten des SDZ und seiner Metabolite sind im Vergleich zum nicht durchwurzelten Boden erhöht, was zu einer geringeren Konzentration des SDZ an der Wurzel im Vergleich zum nicht durchwurzelten Boden führt.

Die schnellere Dissipation des SDZ korrespondiert mit den niedrigeren relativen *sul*-Abundanzen in der Rhizosphäre. Die geschätzte SDZ-Exposition in der Rhizosphäre korrespondiert signifikant mit den geringeren relativen Abundanzen von *sul*-Genen.

Der größte Teil der SDZ-Resistenz vermittelnden Plasmide, die in diesem Experiment isoliert wurden, gehörte zur Gruppe der „Low GC-Plasmide“, deren Antibiogramme sehr heterogen waren.

Was fehlt?

Welche Charakteristika der Rhizosphäre sind verantwortlich für die schnellere Dissipation des SDZ?

Welche Rhizosphäreneffekte gibt es noch, die sich womöglich auf das Resistenzniveau und den horizontalen Gentransfer an der Wurzel auswirken?

Inwieweit sind diese Ergebnisse auf andere Antibiotika, andere Böden und andere Pflanzen übertragbar?

Welchen Wirtsbereich hat das pHHV216-Plasmid, wer sind die natürlichen Wirte des Plasmids in Boden, Rhizosphäre und Gülle, und welche ökologischen Limitierungen hat es?

3.2 Erhöhte Abundanz und Transferabilität von Resistenzgenen nach Feldapplikation von Gülle von Sulfadiazin-behandelten Schweinen

Increased abundance and transferability of resistance genes after field application of manure from Sulfadiazine-treated pigs

Literaturangabe:

Sven Jechalke, Christoph Kopmann, Ingrid Rosendahl, Joost Groeneweg, Viola Weichert, Ellen Krögerrecklenfort, Nikola Brandes, Mathias Nordwig, Guo-Chun Ding, Jan Siemens, Holger Heuer, Kornelia Smalla. 2013. Increased abundance and transferability of resistance genes after field application of manure from sulfadiazine-treated pigs. *Applied and Environmental Microbiology* 79: 1704-1711

Inhaltsangabe:

In dieser Veröffentlichung wurden die unterschiedlichen Reaktionen der bakteriellen Bodengemeinschaften in der Rhizosphäre sowie im nicht durchwurzelten Boden auf Selektionsdruck, verursacht durch SDZ-belastete Schweinegülle, in einem Feldversuch über die Dauer einer Pflanzungsperiode untersucht. Um die Hypothese zu überprüfen, dass die Abundanz und Transferabilität von *sul*-Genen durch die Rhizosphäre positiv beeinflusst wird, wurden die relativen *sul*-Abundanzen und die Transferabilität der *sul*-Gene dieser beiden Kompartimente zu verschiedenen Zeitpunkten untersucht. Des weiteren wurden die Effekte der wiederholten Begüllung in diesem Feldexperiment untersucht.

Dieses Experiment wurde im Rahmen des FOR 566-Projektes von Arbeitsgruppen mit der Kompetenz zur Durchführung von chemischen Analysen begleitet, um die SDZ-Konzentrationen im Boden mit der Differenzierung zwischen biologisch verfügbarem und nicht verfügbarem SDZ zu komplementieren.

3.2.1 Zusammenfassung

In diesem Feldversuch wurden die Effekte von wiederholter Begüllung mit SDZ-belasteter Gülle und der Rhizosphäre auf die relative *sul*-Genabundanz sowie der Transferabilität der SDZ-Resistenzgene über eine Vegetationsperiode untersucht. Im Gegensatz zu einigen Mikrokosmosstudien wurde keine Akkumulation der Resistenzgene mit wiederholter Begüllung gemessen. Im Gegenteil, die relativen *sul*-Abundanzen unterschritten sogar teilweise die initialen relativen *sul*-Abundanzen, was auf die Bedeutung klimatischer Faktoren für Abundanz und Transferabilität von Antibiotikaresistenzgenen im Boden hinweist. Obwohl die Rhizosphäre die Dissipation des biologisch verfügbaren SDZ beschleunigte und die relativen *sul*-Abundanzen nach der Gülleapplikation schnell wieder das initiale Niveau erreichten, konnten wir einen fortlaufenden selektiven Effekt in der Rhizosphäre sowie eine erhöhte Transferabilität der SDZ-Resistenzgene in diesem Kompartiment messen.

3.2.2 Einfluss der wiederholten Gülleapplikation auf die relative *sul*-Genabundanz

Der Effekt von Gülle von SDZ-behandelten bzw. unbehandelten Schweinen auf die relative *sul*-Resistenzgenabundanz im nicht durchwurzelter Boden und in der Rhizosphäre von Gras und Mais wurde kultivierungsunabhängig durch Analyse von Gesamt-DNA untersucht. Zu diesem Zweck wurde die relative *sul*-Genabundanz im Verhältnis zu den 16S rRNA-Genen (*rrn*) an verschiedenen Zeitpunkten gemessen. Im unbehandelten Boden (vor der Güllezugabe, Tag -1) lag die relative Abundanz im Bereich von $-5,9 \pm 0,5$ log für *sul1* und von $-4,1 \pm 0,2$ log für *sul2* (4 Replikate; $n=4$), während die relative Abundanz von *sul1* und *sul2* in der Gülle am Tag 3 um 4 bzw. 3 log-Einheiten erhöht war, mit einer Abundanz von -1 bis -3 log-Einheiten für *sul1* und -1 bis -2 log-Einheiten für *sul2*. Die relative *sul2*-Abundanz war in der SDZ-Gülle im Durchschnitt 0,6 log-Einheiten höher als in der Kontrollgülle (*t*-test; $P < 0,05$), derselbe Trend wurde für die relative *sul1*-Abundanz beobachtet (*t*-test; $P=0,052$). An Tag 2 und 7 nach der Begüllung mit SDZ- oder Kontrollgülle waren die relativen Abundanzen um vier Größenordnungen bei *sul1* und um drei Größenordnungen bei *sul2* im Vergleich zu den Kontrollböden erhöht (Abbildung 10). In der Grasrhizosphäre waren die Werte für *sul1* und *sul2* um eine bis zwei Größenordnungen niedriger als im nicht durchwurzelter Boden. Die Maisrhizosphäre wurde ab dem 42. Tag nach der Begüllung beprobt. Zu diesem Zeitpunkt zeigte die Maisrhizosphäre ähnliche *sul*-Abundanzen wie bei der Grasrhizosphäre am Tag 7. Nach der initialen Erhöhung der *sul*-Abundanzen wurde ein allgemeiner Abfall im

nicht durchwurzelten Boden sowie in der Rhizosphäre von Mais und Gras beobachtet. Der Abfall der *sul*-Abundanz war am Anfang schneller und verlangsamte sich mit der Zeit, besonders in der Grashizosphäre, wo sich offensichtlich ab Tag 77 nach der Begüllung ein konstantes Niveau der *sul*-Abundanz eingestellt hat.

Interessanterweise führten die zweite und dritte Begüllung nicht zu einem so starken Anstieg der *sul*-Abundanz wie die erste Begüllung, es wurde sogar ein Abfall der relativen *sul*-Abundanzen um eine Größenordnung beobachtet. Das Verhältnis der 16S rRNA-Gene pro ml Gülle (*rrn*/ml Gülle) lag bei allen drei Güllen im Bereich von 10-12 log-Einheiten pro ml. Unabhängig von der Begüllung lagen die absoluten Werte der 16S rRNA-Gene pro Gramm Boden konstant bei 9,5 bis 10,5 log-Einheiten im nicht durchwurzelten Boden sowie 10,5-11 log-Einheiten in der Rhizosphäre.

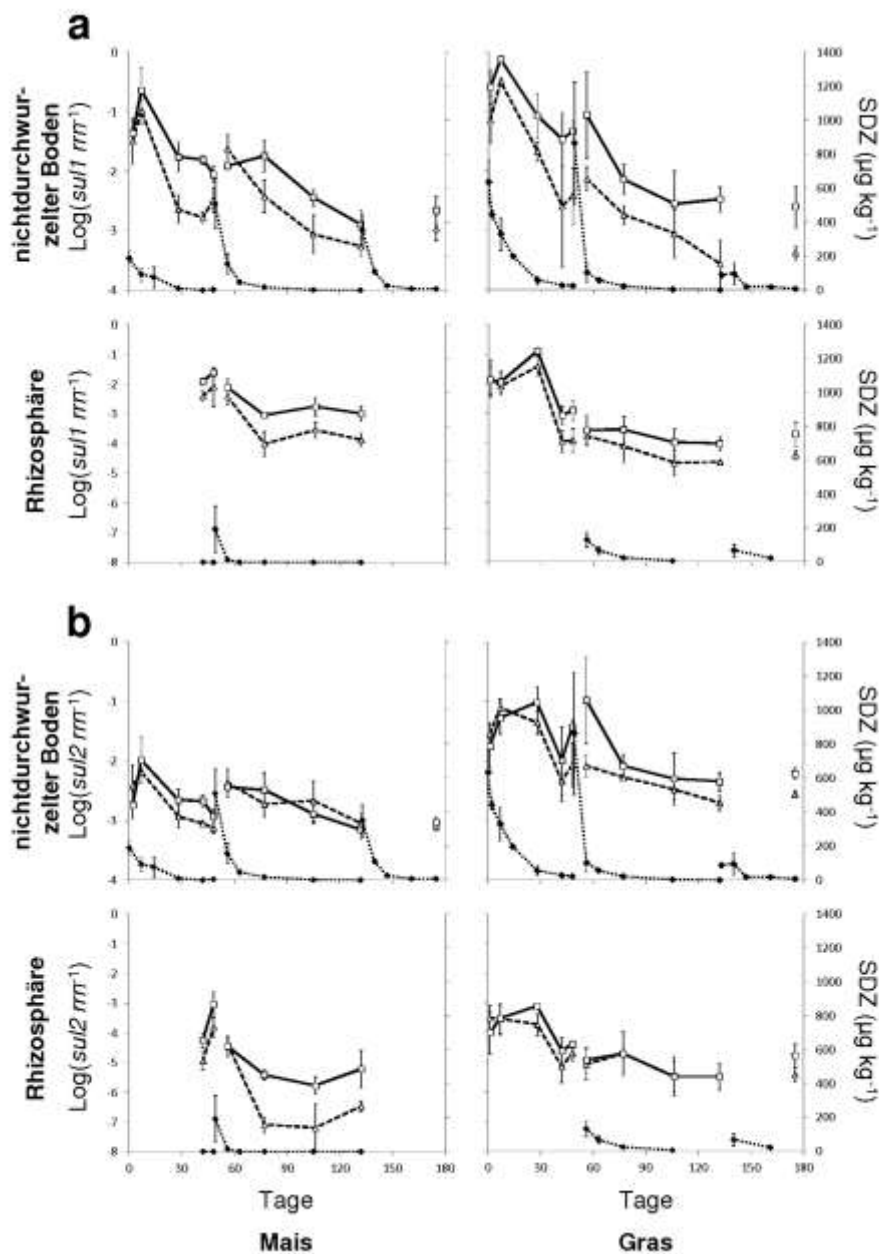


Abbildung 10: Die relativen Genabundanz von *sul1* und *sul2* aufgetragen gegen die Zeit im nicht durchwurzelter Boden und in der Rhizosphäre von Mais und Gras. Die relativen *sul*-Abundanz von Böden, die mit Gülle von SDZ-behandelten Schweinen behandelt wurden, sind mit Vierecken und durchgängiger Linie dargestellt, während die mit unbelasteter Gülle behandelten Böden mit Dreiecken und gestrichelter Linie dargestellt sind. Die Zeiträume zwischen den Gülleapplikationen sind durchgängig, während die Brüche die Datenpunkte vor und nach der Gülleapplikation (an den Tagen 0, 49 und 133) darstellen. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung von 3 bzw. 4 Replikaten dar.

3.2.3 Eintrag der *sul*-Gene durch die Gülle und ihre Selektion im Boden

Nach der ersten Gülleapplikation stiegen die relativen *sul*-Abundanzen im nicht durchwurzelter Boden und in der Rhizosphäre um vier Größenordnungen an und erreichten Werte, wie sie in der Gülle zu finden sind. Die *sul*-Genkopiezahlen waren in den SDZ-behandelten Böden verglichen mit den Kontrollböden nur leicht, aber dennoch signifikant erhöht, die Differenz war vergleichbar mit der Differenz zwischen der Gülle von den SDZ-behandelten Schweinen und der Kontrollgülle. Diese Beobachtung passt zu den Ergebnissen anderer Mikro- und Mesokosmosstudien (Heuer & Smalla, 2007, Heuer *et al.*, 2009, Kopmann *et al.*, 2013), bei denen neben der Selektion der Resistenzgene durch das SDZ ebenfalls ein initialer Anstieg der relativen *sul*-Genkopiezahlen beobachtet wurde, vermutlich verursacht durch den Eintrag *sul*-Gen-tragender SDZ-resistenter Populationen durch die Gülle in den Boden. Im Gegensatz zum Mikrokosmosversuch von (Heuer *et al.*, 2011b) konnte im Feld allerdings nach wiederholter Begüllung weder eine Akkumulation der *sul*-Gene noch eine Akkumulation des SDZ in der einfach zu extrahierenden Fraktion festgestellt werden. Grund dafür könnte der geringere Nährstoffeintrag durch Verdünnung der Güllen sein. In diesem Mikrokosmosversuch konnte nach wiederholter Begüllung, die in der Landwirtschaft gängige Praxis ist (Montforts *et al.*, 1999), eine graduelle Akkumulation der Resistenzgene beobachtet werden. In der hier vorgestellten Feldstudie sanken die relativen *sul*-Abundanzen genau wie die SDZ-Konzentrationen über den gesamten Versuchszeitraum von sechs Monaten ab, sie fielen sogar unter die initialen *sul*-Abundanzen im nicht durchwurzelter Boden (Abbildung 10). Im Gegensatz zu der Mikrokosmosstudie von Heuer *et al.* 2011, bei der das SDZ in hohen Konzentrationen zu der Gülle gegeben wurde, wurde in diesem Experiment Gülle von Schweinen verwendet, die mit SDZ behandelt wurden, um ein realistischeres Szenario bezüglich der SDZ-Konzentrationen und SDZ-Metaboliten, der Resistenzgenabundanz und der mikrobiellen Gemeinschaft zu bekommen. Dies brachte allerdings auch den Nachteil mit sich, dass sich die SDZ- und die Kontrollgülle hinsichtlich der mikrobiellen Struktur, der Resistenzgenabundanz und in physiologischen Parametern unterschieden. Bakterielle Populationen aus der Gülle, die *sul1*- und *sul2*-Gene beherbergten, mögen nicht so gut an die Bodenbedingungen adaptiert gewesen sein und konnten daher in ihrer Abundanz im Vergleich zu den Bodenbakterien sinken (Hammesfahr *et al.*, 2008, Heuer *et al.*, 2008b). Um die deutschen Bestimmungen zur Gülleapplikation einzuhalten, wurde die Menge der zu applizierenden Gülle an Tag 48 und 132 reduziert (der maximale Eintrag von Stickstoff pro Jahr beträgt 80 kg/ha),

was auch zu einer Reduktion des Eintrags von *sul*-Genen und SDZ-resistenten Populationen über die Gülle führte und möglicherweise zum allgemeinen Abfall der *sul*-Genabundanz über die Versuchszeit beitrug. Die Selektion des SDZ wirkte dem Abfall der *sul*-Abundanzen entgegen, allerdings sank die Konzentration des einfach zu extrahierenden SDZ, das als Maß für das bioverfügbare SDZ im Boden angesehen werden kann (Thiele-Bruhn & Aust, 2004), ebenfalls rapide nach der Begüllung ab, mit Halbwertszeiten von 2-12 Tagen (Rosendahl *et al.*, 2011). Verglichen mit dem Laborexperiment war die Dissipation im Feldversuch schneller nach der ersten und zweiten Begüllung, während sie verhältnismäßig langsam nach der dritten Gülleapplikation war (Rosendahl *et al.*, 2011). Die schnellere Dissipation des leicht zu extrahierenden SDZ unter Feldversuchsbedingungen verglichen mit Laborbedingungen (Heuer *et al.*, 2011b) könnte zu geringerem Selektionsdruck geführt haben, der wiederum zur Abnahme der relativen *sul*-Abundanz über die Zeit führte. Es wurden Hinweise dafür gefunden, dass Temperatur und Bodenfeuchte wichtige Faktoren für die Dissipation des SDZ sind. So haben Veränderungen der Bodenfeuchte Effekte auf die Sorption und Sequestration sowie auf die Bildung der nicht extrahierbaren Fraktion (Rosendahl *et al.*, 2011).

3.2.4 Der Effekt der SDZ-Gülle auf die Rhizosphäre verglichen mit nicht durchwurzeltem Boden

In der Rhizosphäre wurden signifikant geringere relative *sul*-Abundanzen über die Zeit erreicht, verglichen mit nicht durchwurzeltem Boden (Abbildung 10, Tabelle 3), was teilweise mit der höheren 16S rRNA-Abundanz an der Wurzel sowie mit dem geringeren Selektionsdruck, hervorgerufen durch die schnellere Dissipation des einfach zu extrahierenden SDZ, erklärt werden könnte (Rosendahl *et al.*, 2011, Kopmann *et al.*, 2013)

	Mais		Gras	
	<i>sul1</i>	<i>sul2</i>	<i>sul1</i>	<i>sul2</i>
Behandlung	13.57**	45.40***	17.43***	68.07***
Zeit	8.63***	34.97***	33.77***	61.74***
Kompartiment	323.21***	19.47***	1561.09***	260.89***
Behandlung x Kompartiment	9.02**	0.94	0.12	2.48
Zeit x Behandlung	0.63	1.7	1.86	1.18

Tabelle 3: Dreifaktorielle Varianzanalyse des Einflusses der Zeit, des SDZ und des Kompartiments (nicht durchwurzelter Boden und Rhizosphäre) sowie ihre jeweiligen Interaktionen. Die F-Werte der einzelnen Faktoren sind hier genannt, ihre Signifikanz ist markiert mit Sternchen ($P < 0,05 = *$, $P < 0,005 = **$, $P < 0,0005 = ***$).

Die Regressionsanalyse zeigt, dass die Differenz der relativen *sul*-Abundanzen zwischen dem SDZ- und dem Kontrollansatz in der Rhizosphäre über die Zeit steigt, während sie im nicht durchwurzelten Boden konstant bleibt (Abbildung 11). Dieses Ergebnis der höheren *sul*-Abundanz kann teilweise durch die wiederholt mit der SDZ-Gülle eingeführten *sul*-Gene erklärt werden, kann aber auch ein Anzeichen dafür sein, dass durch den Selektionsdruck die SDZ-Resistenz tragenden Bakterien einen Vorteil hatten, auch wenn die SDZ-Konzentrationen des einfach zu extrahierenden SDZ weit unter der publizierten minimalen Inhibitionskonzentration des SDZ von 48 mg/kg (Thiele-Bruhn, 2005) lagen. Vor kurzem konnte gezeigt werden, dass eine Selektion von Antibiotikaresistenzgenen noch unter der 100-fachen minimalen Inhibitionskonzentration messbar ist (Gullberg *et al.*, 2011). Dies wird von einer Studie unterstützt, die denselben Boden benutzt wie unser Experiment, in der die SDZ-Konzentrationen über die Zeit sanken, während die Effekte auf die Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaft über die Zeit stiegen (Hammesfahr *et al.*, 2008). Trotz der schnelleren Dissipation des einfach zu extrahierenden SDZ in der Rhizosphäre schien eine Kombination aus konstanter, aber geringer Freisetzung von fest gebundenem SDZ (Zarfl *et al.*, 2009, Wehrhan *et al.*, 2010) und einer erhöhten mikrobiellen Aktivität in der Rhizosphäre, verursacht durch Wurzelexsudate, einen geringen, aber konstanten selektiven Druck des bakteriostatischen SDZ erzeugt zu haben. Im nicht durchwurzelten Boden war die mikrobielle Aktivität durch nicht vorhandene Wurzelexsudate geringer, was auch den Effekt des SDZ verringerte, da es ausschließlich bei wachsenden Zellen einen Effekt

hat (Bock *et al.*, 1974, Achari *et al.*, 1997). Die konstante Differenz in der relativen *sul*-Abundanz, die zwischen dem SDZ- und dem Kontrollansatz des nicht durchwurzelten Bodens verzeichnet wurde, könnte durch die mit der Gülle eingeführten *sul*-Gene entstanden sein, die innerhalb einer kurzen Zeit durch die Nährstoffe und durch das SDZ, das mit der Gülle in den Boden inokuliert wurde, einer Selektion unterlagen, was den initialen Anstieg der *sul*-Abundanzen zwischen Tag 1 und Tag 7 erklären würde (Abbildung 10).

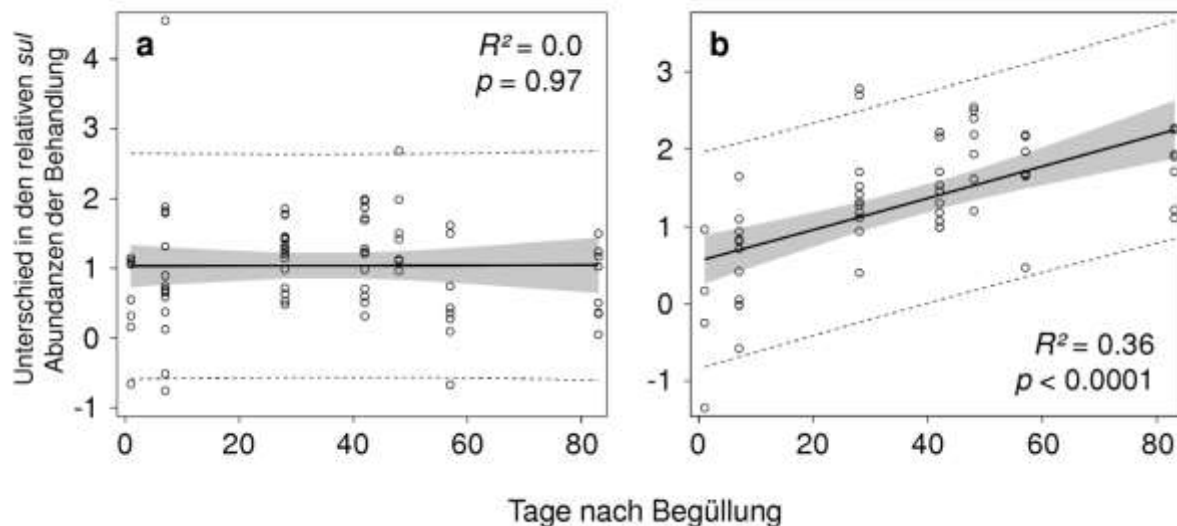


Abbildung 11: Der Effekt des SDZ auf die relative *sul1*- und *sul2*-Abundanz im nicht durchwurzelten Boden (a) und in der Rhizosphäre (b) stellt die Differenz der relativen *sul*-Abundanzen in log-Einheiten zwischen den SDZ- und Kontrollansätzen gegen die Zeit nach der letzten Gülleapplikation dar. Die durchgehenden Linien repräsentieren das lineare Regressionsmodell, grau markiert den Bereich des 95 %-Konfidenzintervalls, die gestrichelte Linie zeigt das 95 %-Vorhersageintervall.

3.2.5 Die Effekte der Zeit, des Kompartiments und der Behandlung auf die relativen *sul*-Abundanzen

Für die Mehrheit der Probezeitpunkte waren die *sul*-Abundanzen in den mit SDZ-Gülle behandelten Böden höher als in den Kontrollböden (Abbildung 10). Die statistische Auswertung offenbarte, dass die relativen *sul*-Abundanzen signifikant beeinflusst werden von den Faktoren Zeit, Behandlung und Kompartiment (Tabelle 3). Es wurden keine signifikanten Interaktionen dieser Faktoren gefunden, mit Ausnahme von *sul1* in Mais, bei dem die Behandlung einen signifikanten Effekt in der Rhizosphäre zeigte ($P < 0,0001$), aber nicht im nicht durchwurzelten Boden ($P = 0,194$).

Um die Zeitperiode zu analysieren, in der das SDZ die relativen *sul*-Abundanzen im Vergleich zur Kontrolle erhöht, wurden die Differenzen der relativen *sul1*- und *sul2*-Abundanzen zwischen Kontrolle und SDZ-Behandlung gegen die Tage nach der Begüllung aufgetragen und der Anstieg wurde per linearem Regressionsmodell auf Signifikanz überprüft (Abbildung 11). Im nicht durchwurzelter Boden war die Differenz der *sul*-Gene zwischen SDZ- und Kontrollbehandlung über die Zeit konstant. Der Anstieg des Resistenzniveaus in der SDZ-Behandlung verglichen mit der Kontrolle geschieht kurz nach der Begüllung und bleibt dann auf konstantem Abstand (Abbildung 11a). Im Gegensatz dazu erhöht sich die Differenz der *sul*-Gene in der SDZ-Behandlung verglichen mit der Kontrollbehandlung in der Rhizosphäre von Mais und Gras über 6 Wochen stetig (Abbildung 11b). Keine weitere Veränderung der Differenzen der *sul*-Abundanzen wurde zwischen den Tagen 42 und 83 nach der Begüllung beobachtet (Abbildung 11b). Im Mittel waren die relativen *sul*-Abundanzen der SDZ-Behandlung im nicht durchwurzelter Boden um 1 log-Größenordnung höher als in der Kontrolle, während die Unterschiede der relativen *sul*-Abundanzen in der Rhizosphäre von 1,5 auf 2 log-Größenordnungen anstiegen.

3.2.6 Transferabilität von Sulfonamidresistenzgenen und den „Low GC-Plasmiden“

Der Effekt der Gülle von SDZ-behandelten Schweinen auf die Transferabilität von SDZ-Resistenzgenen im nicht durchwurzelter Boden sowie der Rhizosphäre wurde durch exogene Plasmidisolierung an den Tagen 48 und 132 untersucht. Nicht durchwurzelter Boden und Rhizosphäre von Gras und Mais wurden durch die SDZ-Behandlung unterschiedlich beeinflusst (Abbildung 12). Am Tag 48 war die Transferfrequenz (TF) der Kontrolle im Gras um ein bis zwei Größenordnungen höher (-4,5 bis 5,5 log-Einheiten) als die Kontrolle im Mais (-6,5 bis -7 log-Einheiten), während beide am Tag 132 auf derselben Höhe von -5 bis -4 log-Einheiten lagen. Aufgrund unterschiedlich durchgeführter Extraktion der mikrobiellen Fraktion aus nicht durchwurzelter Boden und der Rhizosphäre konnten die Unterschiede der beiden Kompartimente quantitativ nur am Tag 132 ausgewertet werden. Am Tag 132 war die TF von der Maisrhizosphärenkontrolle im Vergleich zu dem nicht durchwurzelter Boden erhöht, während bei dem Grasansatz kein Unterschied zu sehen war (Tukey Test; $P < 0,05$).

Die SDZ-Behandlung hat die TF im nicht durchwurzelter Maisboden erhöht, während keine Erhöhung im nicht durchwurzelter Grasboden zu verzeichnen war. Ein klarer Anstieg der TF war bei den Rhizosphären beider Pflanzen in den SDZ-Behandlungen

zu verzeichnen, mit Ausnahme der Maisrhizosphäre am Tag 132. Der höchste Anstieg der TF von über 2 Größenordnungen war beim Mais am Tag 48 und beim Gras am Tag 132 zu verzeichnen.

Die Plasmid-DNA von 292 Transkonjuganten wurde extrahiert und mit „Low GC“-spezifischen *rep*-Gen-Primern amplifiziert. Ein 912 bp großes Produkt, charakteristisch für die „Low GC-Plasmid“-Gruppe, wurde von 97 % (187 von 192 Plasmiden) der Transkonjuganten des Tages 48 bzw. von 98 % (98 von 100 Plasmiden) der Transkonjuganten des Tages 132 erhalten.

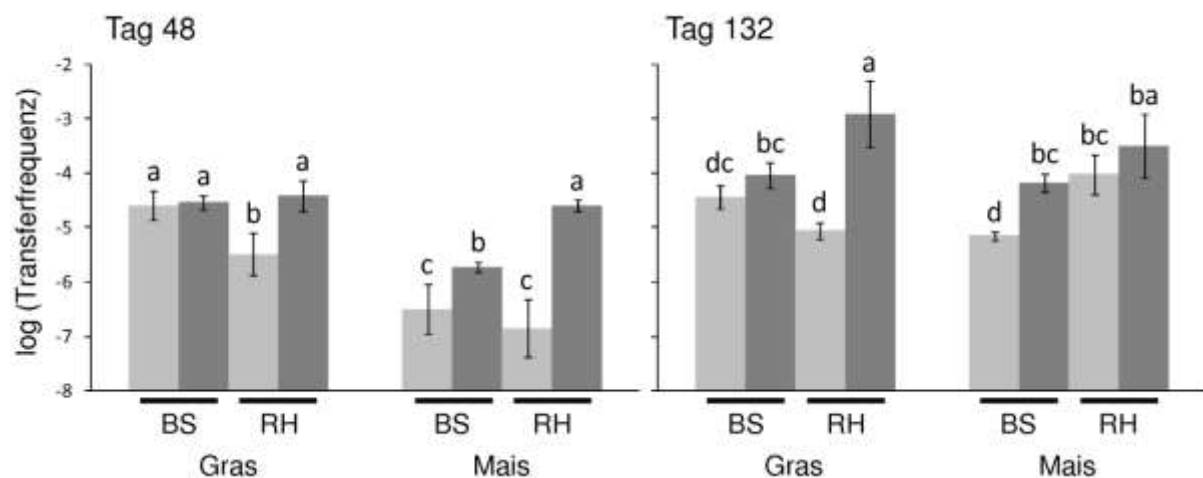


Abbildung 12: Effekt der SDZ-Gülle auf den Transfer von Sulfonamidresistenzgenen von Bakterien in nicht durchwurzeltem Boden (engl. bulk soil = BS) bzw. in der Rhizosphäre (RH) zu *E. coli* K-12 CV601gfp. Die TF pro Rezipientenzelle wurden per Filtermatings am Tag 48 und 132 von den Gras- und Maisfeldproben bestimmt. Unterschiedliche Buchstaben stehen für signifikante Unterschiede der Mittelwerte bei paarweisen Vergleichen (Tukey Test; $P < 0,05$) für jeden Tag. Die TF aus den mit der Kontrollgülle behandelten Proben sind in hellgrau dargestellt, während die TF der SDZ-Gülle-behandelten Proben in dunkelgrau dargestellt sind. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung aus vier Replikaten (Ausnahme Maisrhizosphäre ohne SDZ, $n = 3$).

3.2.7 Der Rhizosphäreneffekt auf die Transferabilität der SDZ-Resistenz

Die *sul*-Gen-Transferabilität wurde an den Tagen 48 und 132 durch die TF von SDZ-Resistenz-vermittelnden Bodenplasmiden in *E. coli* ermittelt. Der Tag 48 wurde zur exogenen Plasmidisolierung ausgesucht, da dieser den spätesten Zeitpunkt vor der zweiten Begüllung am Tag 49 darstellte und gleichzeitig die Maiswurzeln die Zeit hatten, sich ausreichend zu entwickeln. Am Tag 132, also 83 Tage nach der zweiten

Begüllung waren die Maispflanzen voll entwickelt und der Effekt der Rhizosphäre auf die TF am Ende der Pflanzungsperiode wurde analysiert. SDZ-vermittelnde Plasmide wurden aus allen Rhizosphären- und nicht durchwurzelter Bodenproben in *E. coli*-Rezipienten gefischt. Dies wurde erwartet, da mehrfach schon gezeigt wurde, dass Begüllung an sich ungeachtet, ob die Gülle mit Antibiotika belastet ist oder nicht, den horizontalen Gentransfer im Boden stimuliert und mobilisierende genetische Elemente in den Boden einträgt (Götz & Smalla, 1997, Heuer & Smalla, 2007, Jechalke *et al.*, 2013c, Kopmann *et al.*, 2013). Von nahezu allen Transkonjuganten wurde nach der Amplifikation mit „Low GC“-Typ spezifischen Primern (Heuer *et al.*, 2009) ein PCR-Produkt erhalten, was ein Indiz für die hohe Abundanz dieses Plasmidtyps darstellt sowie dessen Potential als Vektor der SDZ-Resistenz zeigt. Auch wenn nur Plasmide gefischt wurden, die in *E. coli* transferieren und replizieren können, unterstützt dieses Ergebnis die angenommene wichtige Rolle des „Low GC-Plasmids“ bei der Verbreitung von Antibiotikaresistenzen in Gülle und begüllten Böden (Heuer *et al.*, 2009, Kopmann *et al.*, 2013).

Bei diesem Experiment wurde eine Erhöhung der *sul*-Gen-Transferabilität nach der Düngung mit Gülle von SDZ-behandelten Schweinen aufgrund des entstehenden selektiven Druckes sowie der erhöhten Nährstoffverfügbarkeit erwartet. Zusätzlich könnten unterschiedliche mikrobielle Gemeinschaften mit unterschiedlicher Abundanz von Plasmiden durch die verschiedenen Güllen zu der erhöhten SDZ-Transferabilität der SDZ-begüllten Böden geführt haben. Eine erhöhte TF wurde in den SDZ-Ansätzen der Mais- und Grasmrhizosphäre am Tag 48 und interessanterweise am Tag 132 nur bei Gras gemessen. Dies ist ein Indiz dafür, dass das Stadium des Pflanzenwachstums Einfluss auf die mikrobielle Aktivität sowie die Transferabilität von Plasmiden mit *sul*-Resistenzgenen hat, da sich die Maisrhizosphäre über den gesamten Versuchszeitraum entwickelt hat, während die Graspflanzen schon zwei Monate vor Versuchsbeginn ausgesät wurden. Ebenfalls könnten pflanzenspezifische Faktoren wie z.B. Bodenfeuchte, beeinflusst durch Wasseraufnahme oder unterschiedliches Wurzelwachstum sowie unterschiedliche Wurzelexsudate, zu unterschiedlichen Effekten auf die mikrobiellen Gemeinschaften geführt haben, die sich womöglich auch auf das Schicksal des Antibiotikums ausgewirkt haben. Diese Beobachtungen passen zu den Erkenntnissen, nach denen es einen pflanzenspezifischen Rhizosphäreneffekt auf den konjugativen Transfer bei Gersten-, Weizen- und Bohnenwurzeln gibt (Schwaner & Kroer, 2001) und pflanzenspezifische Unterschiede in der Zusammensetzung der bakteriellen Gemeinschaften an Wurzeln mit Hilfe der DGGE gezeigt werden konnten (Smalla *et*

al., 2001). Solche pflanzenspezifischen Unterschiede sowie das unterschiedliche Wachstumsstadium könnten die erhöhten TF der Grashizosphäre am Tag 48 erklären. Die aktive Einarbeitung der Gülle sowie des SDZ bis in 12 cm Tiefe bei der ersten Gülleapplikation in den Maisplots könnte die Nährstoffverfügbarkeit sowie den selektiven Druck zusätzlich erhöht und so zu einer verstärkten Erhöhung der Transferfrequenz im SDZ-Maisansatz verglichen mit dem Kontrollansatz geführt haben. Die geringere Transferfrequenz des nicht durchwurzelten Maisbodens verglichen mit dem nicht durchwurzelten Grasboden könnte durch das dicht gewachsene Graswurzelnnetz verursacht worden sein, da deren Rhizosphäreneffekt bis in den nicht durchwurzelten Boden hineingereicht haben dürfte.

Die Erhöhung der Abundanz sowie des Transfers von Resistenzgenen im nicht durchwurzelten Boden sowie an der Wurzel durch die Düngung mit Gülle von SDZ-behandelten Schweinen könnte zu dem ernsthaften Problem der zunehmenden Verbreitung von Antibiotikaresistenzen beitragen, da z.B. die *sul1*-Gene oft mit Klasse 1-Integron Genkassetten assoziiert sind, die Genkassetten aufnehmen und austauschen können und unter den Gram-negativen Bakterien sehr weit verbreitet sind. Ebenfalls findet man das *sul2*-Gen oft mit *strA-strB*-Genen kombiniert wie z.B. in den „Low GC-Plasmiden“. Zusammenfassend kann man sagen, dass sich die Effekte von SDZ auf die Transferabilität von Antibiotikaresistenzen in der Rhizosphäre und in dem nicht durchwurzelten Boden enorm unterscheiden, eine Erkenntnis, die man bei der Risikobewertung von sich verbreitenden Antibiotikaresistenzen in der Umwelt mit einbeziehen muss.

3.2.8 Fazit

Was war bekannt?

Gülle und mit SDZ versetzte Gülle steigern in hohen Konzentrationen die Abundanz und Transferabilität von SDZ-Resistenzgenen innerhalb bakterieller Bodengemeinschaften.

Die Rhizosphäre kann die selektive Wirkung von SDZ auf bakterielle Bodengemeinschaften abschwächen.

Die strukturelle Zusammensetzung der bakteriellen Gemeinschaften und somit ihre Reaktion auf Antibiotika ist abhängig von der Pflanzenart und dem Pflanzenalter.

Wiederholte Begüllung mit SDZ-versetzter Gülle führte in Mikrokosmosversuchen zur Akkumulation der *sul*-Resistenzgene in den bakteriellen Bodengemeinschaften.

Die heterogene „Low GC-Plasmidgruppe“ wurde häufig in Güllen und begüllten Böden als resistenzvermittelnde Plasmidgruppe gefunden.

Was ist neu?

Erstmals konnte unter Feldbedingungen gezeigt werden, dass Gülle von Schweinen, die mit SDZ behandelt wurden, die Abundanz und Transferabilität von SDZ-Resistenzgenen innerhalb bakterieller Bodengemeinschaften im Vergleich zu mit Kontrollgülle behandelten Böden erhöht.

Die *sul*-Genabundanz der Gras- und Maisrhizosphäre war auch im Feldversuch niedriger als im nichtdurchwurzelter Boden.

Es gibt Pflanzenart- und Pflanzenwachstumsstadium abhängige Unterschiede in der Reaktion der bakteriellen Boden- und Rhizosphäregemeinschaften, allerdings waren diese unbeständig, so dass dazu aus diesem Feldversuch keine allgemeingültigen Schlussfolgerungen gezogen werden konnten.

Eine wiederholte Begüllung mit SDZ-Gülle führte im Feldversuch nicht zu einer Akkumulation der *sul*-Resistenzgene in den bakteriellen Gemeinschaften, was auf den Einfluss auf geringeren Selektionsdruck und Nährstoffeintrag und von Klimafaktoren auf die Abundanz und Transferabilität von Resistenzgenen in bakteriellen Gemeinschaften zurückzuführen war.

Der mit Abstand größte Teil der SDZ-Resistenz vermittelnden Plasmide (97 %), die in diesem Experiment in *E. coli* isoliert wurden, gehörte zur „Low GC-Plasmidgruppe“.

Was fehlt?

Worin unterscheidet sich die Reaktion der bakteriellen Boden- und Rhizosphärengemeinschaften auf Gülle, die mit SDZ versetzt wurde, verglichen mit Gülle, die von SDZ-behandelten Schweinen kommt und über eine angepasste Bakteriengemeinschaft verfügt?

Welche Rhizosphäreneffekte gibt es noch, die sich womöglich auf das Resistenzgenniveau und den HGT an der Wurzel auswirken?

Pflanzenart- und pflanzenalterspezifische Effekte auf die Struktur der bakteriellen Gemeinschaften müssen genauer untersucht werden, bevor man sie im Feldversuch weitergehend interpretieren kann.

Welche Klimafaktoren beeinflussen die Abundanz und Transferabilität von Resistenzgenen in bakteriellen Gemeinschaften unter Selektionsdruck, und wie ist ihr Einfluss gewichtet? Wie bewirken sie, dass es nicht zu einer Akkumulation der Resistenzgene unter Selektionsdruck bei wiederholter Begüllung im Feldversuch kommt?

Inwieweit sind diese Ergebnisse auf andere Antibiotika, andere Böden und andere Pflanzen übertragbar?

Welchen Wirtsbereich haben LowGC-Plasmide wie das Plasmid pHHV216-, wer sind die natürlichen Wirte dieser Plasmidgruppe im Boden, in der Rhizosphäre und in der Gülle, und wie ist die durch den Wirt bedingte Plasmidökologie?

3.3 Plasmidvermittelter Fitnessvorteil von *Acinetobacter baylyi* in Sulfadiazin-belastetem Boden

Plasmid-mediated fitness advantage of *Acinetobacter baylyi* in sulfadiazine-polluted soil

Literaturangabe:

Sven Jechalke, Christoph Kopmann, Mona Richter, Sylvia Moenickes, Holger Heuer, Kornelia Smalla. 2013. Plasmid-mediated fitness advantage of *Acinetobacter baylyi* in sulfadiazine-polluted soil. FEMS Microbiology Ecology Lett 348: 127-132

Inhaltsangabe:

In diesem Experiment wurde das Potential des pHHV216-Plasmids, einen Selektionsvorteil für *Acinetobacter baylyi* in nicht durchwurzeltem Boden und mit SDZ gespickter Gülle zu vermitteln, bewiesen. Dazu wurden gleiche Zahlen von plasmidfreien und das Plasmid pHHV216 tragende Rifampicin-resistente *Acinetobacter baylyi* Zellen in Boden eingebracht, auf dem Gülle mit und ohne SDZ ausgebracht worden war. Die *Acinetobacter*-Populationszahlen sowie der Anteil der Plasmidtragenden Population wurden zu verschiedenen Zeitpunkten ermittelt.

3.3.1 Zusammenfassung

In diesen zwei Kompetitionsversuchen sollten die Effekte eines Selektionsdrucks auf die Abundanz des SDZ-Resistenz vermittelnden pHHV216-Plasmids im nicht durchwurzelten Boden und in der Rhizosphäre untersucht werden. Dazu wurde eine Population von *Acinetobacter baylyi* zur Hälfte plasmidhaltig bzw. plasmidfrei im Boden inokuliert und die Abnahme bzw. Zunahme des Anteils Plasmidtragender Zellen bezüglich der Faktoren Kompartiment und Selektionsdruck quantifiziert. Ein signifikanter Effekt des SDZ auf den Anteil Plasmidtragender *Acinetobacter*-Populationen konnte detektiert werden. Das experimentelle Design könnte in Zukunft dazu verwendet werden, den von einem Antibiotikum verursachten Selektionsdruck im Boden einfach und reproduzierbar nachzuweisen.

3.3.2 Ergebnisse und Diskussion

Der Fitnessvorteil des pHHV216-Plasmids für *Acinetobacter baylyi* BD413 im Boden nach Applikation von Gülle bzw. SDZ-belasteter Gülle wurde in zwei unabhängigen Mikrokosmosexperimenten untersucht (Versuche 1 und 2).

Nach der Applikation von Gülle und *Acinetobacter* in Boden (die Hälfte der Population war plasmidfrei und die andere Hälfte trug das Plasmid pHHV216) wurden die Veränderungen des Anteils Plasmid-tragender Zellen über die Zeit untersucht.

Im ersten Versuch wurden signifikant mehr koloniebildende Einheiten im mit SDZ-Gülle behandelten Boden ausgezählt (Abbildung 13a). Die Zahlen der koloniebildenden Einheiten blieben im ersten Versuch bis zum Tag 21 relativ stabil, während sie zwischen Tag 21 und Tag 28 um eine halbe Größenordnung sanken. Im zweiten Versuch sanken die Zahlen der koloniebildenden Einheiten über 32 Tage um eine halbe Größenordnung. Dieses Phänomen scheint nicht von der Anwesenheit des SDZ beeinflusst worden zu sein, da sich die Zahlen zwischen den beiden Behandlungen (mit und ohne SDZ) nur an den Tagen 2, 28 und 32 signifikant unterschieden mit dem Trend einer leicht erhöhten Zahl an koloniebildenden Einheiten im Kontrollansatz (Abbildung 13b).

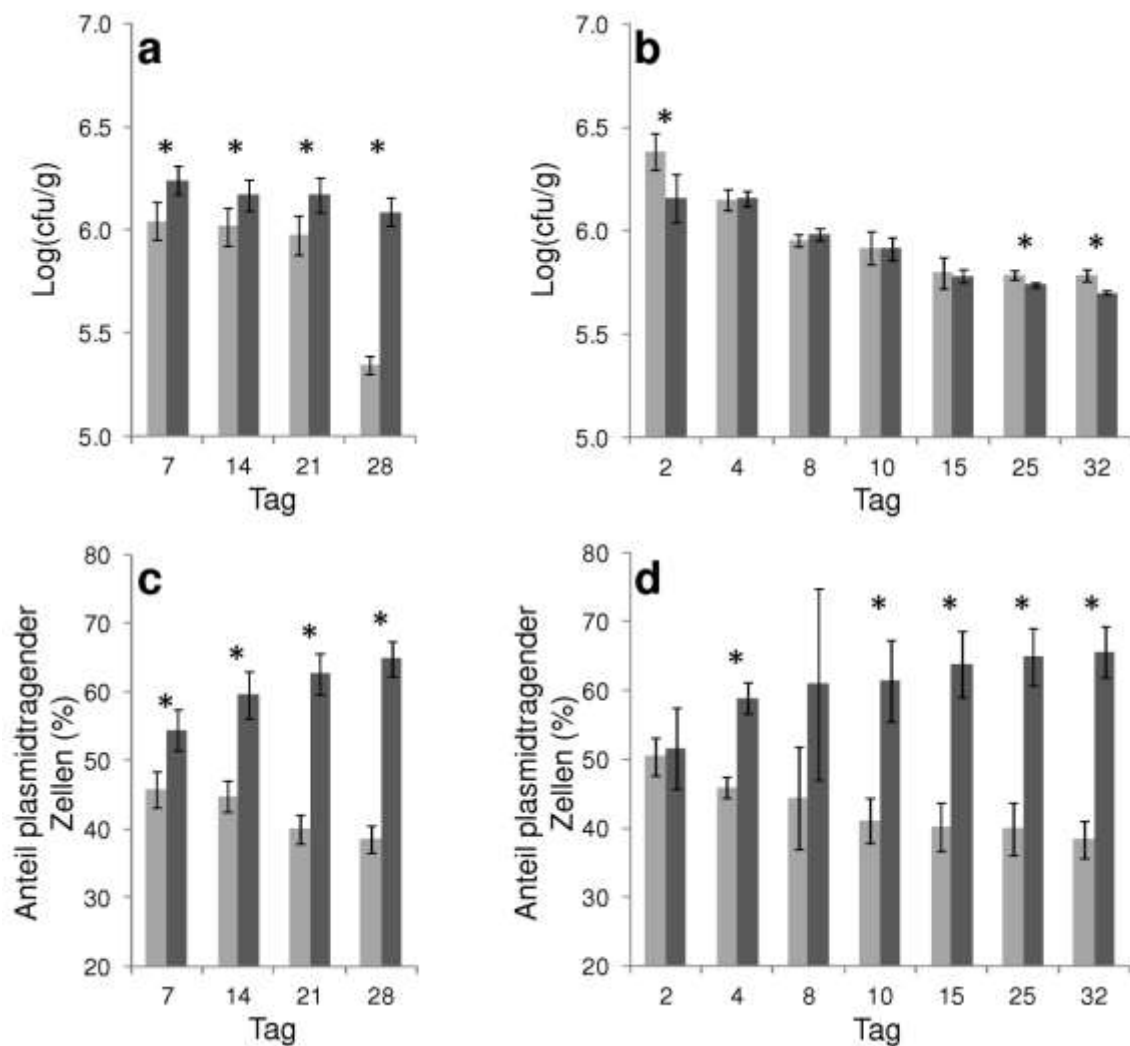


Abbildung 13: Koloniebildende Einheiten pro Gramm Boden und die Verteilung der plasmidtragenden Isolate von *Acinetobacter baylyi* BD423 des ersten Versuchs (a und c) und des zweiten Versuchs (b und d), aufgetragen gegen die Tage seit Beginn des Experiments. Die SDZ-behandelten Böden sind dunkelgrau und die nur mit Gülle behandelten Böden hellgrau dargestellt. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung von fünf Replikaten im ersten Versuch bzw. vier Replikaten im zweiten Versuch. Signifikante Unterschiede zwischen den Behandlungen sind mit einem Sternchen markiert ($P < 0,05$, t -test).

Acinetobacter baylyi BD413 wurde für diese Studie verwendet, da er als potentieller Wirt des Plasmids pHHV216 identifiziert wurde (Heuer *et al.*, 2009). Der Stamm BD413 leitet sich vom Stamm BD4 ab, der von Juni & Janik (1969) aus dem Boden isoliert wurde und für hohe natürliche Kompetenz zur Aufnahme freier DNA sowie für seine Pilibildung bekannt ist. Typ IV-Pili könnten für Anhaftung an biotische und abiotische Oberflächen von Bedeutung sein (Gohl *et al.*, 2006).

Deswegen ist es sehr wahrscheinlich, dass der Stamm BD413 gut an Bodenbedingungen adaptiert ist und Bodenpartikel über die Bildung eines Biofilms kolonisiert. In diesem Experiment sank die Abundanz von *A. baylyi* BD413, der in sehr hoher Zahl in den Boden inokuliert wurde, über eine Dauer von 32 Tagen kontinuierlich ab. Das könnte ein Hinweis auf die Überschreitung der Kapazität des Bodens für eine *A. baylyi* BD413-Population sein. Im zweiten Experiment war kein signifikanter Unterschied zwischen BD413 CFU-Zahlen des SDZ- und des Kontrollansatzes zwischen den Tagen 4 und 15 zu detektieren. Dies indiziert, dass das SDZ in diesem Zeitraum keinen messbaren Einfluss auf die *A. baylyi* BD413-Abundanz hatte. Im ersten Experiment waren die Zellzahlen des SDZ-Ansatzes höher als die im Kontrollansatz. Diese Differenz blieb bis zum Tag 21 stabil. Obwohl nicht ausgeschlossen werden kann, dass dieser Unterschied vom Beginn des Experiments stammt und unterschiedliche Zellzahlen in den Boden inokuliert wurden, suggeriert er einen initialen Vorteil des *A. baylyi* BD413 pHHV216 im Boden mit SDZ im Vergleich zum Kontrollboden. Weiterführende Experimente sind notwendig, um zu klären, welchen Effekt die Verringerung der Inokulumzahlen auf die Fitness und das Überleben des *A. baylyi* BD413 im Boden hat.

Bisherige Studien haben gezeigt, dass die SDZ-Konzentration in der EAS-Fraktion, die als potentiell bioverfügbare Fraktion des SDZ im Boden gilt, nach Inokulierung in den Boden via Gülle schnell abnimmt (Thiele-Bruhn & Aust, 2004, Kreuzig & Höltge, 2005, Rosendahl *et al.*, 2011, Sittig *et al.*, 2012, Kopmann *et al.*, 2013). In der Tat könnte die rapide Abnahme der SDZ-Konzentration in der leicht zu extrahierenden Fraktion der Grund dafür sein, dass die *A. baylyi*-Population nur initial vom SDZ beeinflusst wurde.

Ohne Selektionsdruck sank der Anteil der plasmidtragenden *Acinetobacter*-Population in beiden Versuchen von 50 % auf unter 40 % (Abbildungen 13c und 13d). Mit Selektionsdruck stieg der Anteil der plasmidtragenden *Acinetobacter*-Population von 50 % auf über 66 %, während die Anreicherung des Plasmids im zweiten Versuch ab dem Tag 15 langsamer stattfand als in den ersten zwei Wochen (Abbildung 13d). Dementsprechend wurde innerhalb der ersten 15 Tage eine nahezu lineare Abnahme der plasmidhaltigen und plasmidfreien *Acinetobacter*-Populationen auf der logarithmischen Skala detektiert (Abbildung 13). Für die Tage 25 und 32 waren nur sehr leichte Abfälle der Populationszahlen zu verzeichnen, während sich der Anteil der plasmidtragenden *Acinetobacter*-Populationen nicht mehr veränderte (Abbildung 14). In dem mit der Kontrollgülle behandelten Boden sank die Zahl der

plasmidtragenden Zellen in den ersten 15 Tagen schneller als die Zahl der plasmidfreien Zellen.

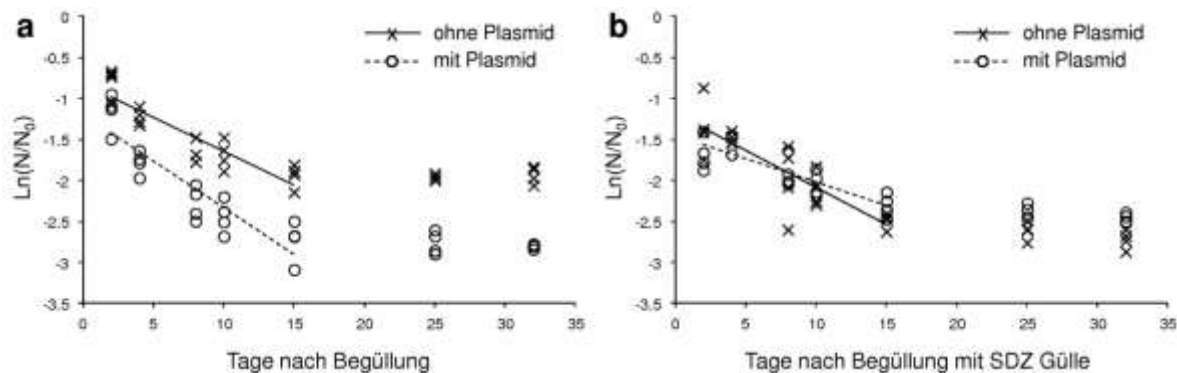


Abbildung 14: Entwicklung der plasmidtragenden (dargestellt mit Kreisen und gestrichelter Linie) und plasmidfreien (dargestellt durch Kreuze und durchgehende Linie) Populationen von *Acinetobacter baylyi* BD413 im Boden des zweiten Versuchs mit Gülle (a) und mit SDZ-belasteter Gülle (b), verglichen mit den Populationszahlen von Tag 0. Die Linien zeigen das lineare Regressionsmodell von Tag 2 bis Tag 15. Die Steigungen der linearen Regressionsmodelle wurden zur Berechnung der Selektionskoeffizienten herangezogen.

Einen signifikanten Anstieg der plasmidtragenden *A. baylyi*-Fraktion im Vergleich zur plasmidfreien Fraktion in den mit SDZ belasteten Böden wurde in zwei unabhängigen Experimenten beobachtet (Abbildung 13). Der Anstieg der plasmidtragenden Fraktion scheint während der ersten 15 Tage intensiver zu sein, was übereinstimmt mit der schnellen Dissipation des SDZ aus der einfach zu extrahierenden Fraktion, z.B. wurde in der Studie von Kopmann *et al.* (2013) eine Halbwertszeit des SDZ in der einfach zu extrahierenden Fraktion von 5,1 Tagen gemessen. Im Kontrollansatz sank der Anteil der plasmidhaltigen *A. baylyi*-Fraktion um 10 %, was einen Fitnessnachteil bzw. die Kosten des Plasmids in Abwesenheit des SDZ darstellt.

Der Selektionskoeffizient betrug in dem mit der Kontrollgülle behandelten Boden im Mittel $0,36 \pm 0,17$, das heißt, die plasmidtragenden Zellen nahmen im Vergleich zu den plasmidfreien Zellen um 36 % schneller ab. Das zeigt einen generellen Fitnessvorteil der plasmidfreien BD413-Zellen. Der Selektionskoeffizient in dem mit der SDZ-Gülle behandelten Boden betrug im Mittel $-0,35 \pm 0,16$, das heißt, die plasmidtragenden Zellen nahmen im Vergleich zu den plasmidfreien Zellen um 35 % langsamer ab. Das zeigt einen generellen Fitnessvorteil der plasmidtragenden BD413-Zellen unter selektiven Bedingungen. Der Selektionskoeffizient war zwischen

den Behandlungen (SDZ und Kontrolle) signifikant unterschiedlich (t -test, $n = 4$, $P = 0,0008$), was den signifikanten Einfluss des SDZ auf die Fitness der plasmidtragenden BD413-Zellen im Vergleich zu den plasmidfreien BD413-Zellen in begüllten Böden unterstreicht. Obwohl die zeitliche Auflösung des ersten Versuchs geringer war, wurde der Selektionskoeffizient ebenfalls kalkuliert und zeigte denselben Trend des zweiten Versuchs. Der Selektionskoeffizient bis zum Tag 28 betrug in dem mit der Kontrollgülle behandelten Boden im Mittel $0,27 \pm 0,16$, das heißt, die plasmidtragenden Zellen nahmen im Vergleich mit den plasmidfreien Zellen um 27 % schneller ab. Der Selektionskoeffizient in dem mit der SDZ-Gülle behandelten Boden betrug im Mittel $-0,85 \pm 0,62$, das heißt, die plasmidtragenden Zellen nahmen im Vergleich mit den plasmidfreien Zellen um 85 % langsamer ab. Derselbe Trend wurde im ersten Experiment trotz geringerer zeitlicher Auflösung beobachtet.

Die Studie von Heuer *et al.* (2007) hat die Stabilität des IncP-1 β Plasmids pB10 in verschiedenen Proteobakterien in Flüssigkulturen untersucht. Hohe Kosten wurden bei dem plasmidhaltigen *Pseudomonas putida* H2 gemessen, die zu in einer Reduktion der Zellteilung um 20% im Vergleich zum plasmidfreien *Pseudomonas putida* H2 führten. Vergleicht man die Ergebnisse der Flüssigkulturen mit denen aus begüllten Böden, sieht man einen noch schnelleren Abfall der plasmidtragenden *A. baylyi*-Fraktion. Vergleicht man die Ergebnisse, muss man natürlich in Betracht ziehen, dass Stamm, Plasmid und Kulturbedingungen verschieden waren, was natürlich Einfluss auf die Ergebnisse hat. Obgleich wir mit diesem Experiment die These aufstellen, dass der Effekt auf das Wachstum und die Konkurrenzfähigkeit des Stammes in den ersten 15 Tagen relativ konstant ist, darf nicht außer Acht gelassen werden, dass andere dynamische Faktoren wie z.B. Nährstoffverfügbarkeit, System-, Kapazitäts- und Populations-interaktionen maßgeblichen Einfluss auf den Transfer und die Proliferation der plasmidtragenden Bakterien haben. Diese Faktoren müssen in Zukunft mit einbezogen werden, wenn man die Dynamik zwischen plasmidfreien und plasmidhaltigen Zellen modellieren will. Zudem muss beachtet werden, dass der Effekt eines Plasmids auf die Fitness eines Wirtes abhängig ist vom Wirtsstamm sowie vom Plasmidtyp, wie zum Beispiel bei Humphrey *et al.* (2012) für IncP-1 und IncN-Plasmide mit breitem Wirtsspektrum gezeigt wurde.

Zusätzlich können die metabolischen Kosten des Plasmids über die Zeit durch Mutationen oder Neuformierung der Plasmide bzw. der Wirts-DNA gesenkt werden. Plasmide können ihren Wirten auch Vorteile im Bezug auf Überlebens- und Kolonisierungsfähigkeit bieten, wie z.B. bei einem plasmidtragenden *Pseudomonas*

fluorescens-Stamm, bei dem im Vergleich zur plasmidfreien Variante die Pflanzenkolonisierungsfähigkeit deutlich erhöht war (Lilley & Bailey, 1997).

Zusammenfassend lässt die Studie den Schluss zu, dass SDZ mit Gülle in den Boden eingebracht, *A. baylyi* mit dem Plasmid pHHV216 einen Selektionsvorteil verschafft, bzw. dass das Plasmid bei nicht vorhandenem Selektionsdruck einen Selektionsnachteil darstellt. Der Ansatz, plasmidhaltige *A. baylyi* zum Nachweis von Selektionsdruck im Boden zu benutzen, konnte in zwei unabhängigen Experimenten erfolgreich gezeigt werden. In Zukunft könnten Konkurrenzexperimente, wie in dieser Studie beschrieben, durchgeführt werden, um die Bioverfügbarkeit von Antibiotika im Boden zu untersuchen. Im nächsten Schritt müsste das Experiment mit verschiedenen SDZ-Konzentrationen wiederholt werden, um die Anwendbarkeit und Empfindlichkeit dieses Werkzeugs zu bestätigen.

3.3.3 Fazit

Was war bekannt?

Das pHHV-216-Plasmid als Vertreter der „Low GC-Plasmidgruppe“ persistiert stabil in *Acinetobacter baylyi*, jedoch nicht in *E. coli*.

Was ist neu?

Das Plasmid hat das Potential, die SDZ-Resistenz innerhalb der *Acinetobacter*-Population im nicht durchwurzelter Boden zu vermitteln.

Unter SDZ-Selektionsdruck vermittelt das pHHV216-Plasmid der *Acinetobacter*-Population einen Fitnessvorteil, was zu seiner Anreicherung im nicht durchwurzelter Boden innerhalb der Population führt.

Was fehlt?

Kann das Plasmid auch unter Rhizosphärebedingungen die SDZ-Resistenz vermitteln und bringt es dort auch einen Fitnessvorteil für die *Acinetobacter*-Population unter Selektionsdruck?

Diese Ergebnisse sind spezifisch für das pHHV216-Plasmid in einer *Acinetobacter*-Population im Merzenhausener Boden unter SDZ-Selektionsdruck. Inwieweit lassen sich diese Ergebnisse auf andere resistenzvermittelnde Plasmide, andere Wirte, andere Antibiotika in anderen Böden übertragen, um daraus ein einfaches universelles Werkzeug zum Nachweis von Selektionsdruck im Boden zu entwickeln?

3.4 Wirtsbereichsbestimmung des Plasmids pHHV216 und Charakterisierung des Einflusses der Rhizosphäre auf den Fitnessvorteil plasmidtragender *Acinetobacter baylyi*-Populationen in Sulfadiazin-belastetem Boden

Literaturangabe:

Christoph Kopmann, Sven Jechalke, Holger Heuer, Kornelia Smalla.

Unveröffentlicht

Inhaltsangabe:

In diesem Experiment wurde das Potential des pHHV216-Plasmids, SDZ-Resistenz in durchwurzelter und nicht durchwurzelter Boden unter Selektionsdruck zu vermitteln, bewiesen. Dazu wurde eine *Acinetobacter*-Population, zur Hälfte mit dem pHHV216-Plasmid ausgestattet, in Boden eingebracht, auf dem SDZ-freie und SDZ-belastete Gülle ausgebracht worden war. Die *Acinetobacter*-Populationszahlen sowie die Plasmidhaltigkeit der Population wurden zu verschiedenen Zeitpunkten untersucht.

Darüber hinaus wurde durch eine Modifizierung des Experiments versucht, mögliche natürliche Wirte für das pHHV216-Plasmid im Boden zu finden.

3.4.1 Zusammenfassung

In dem hier durchgeführten Wettbewerbsversuch wurden die Plasmiddynamiken der bakteriellen Fraktionen des nicht durchwurzelten Bodens und der Rhizosphäre miteinander mit und ohne Selektionsdruck verglichen. Dabei sollte insbesondere untersucht werden, ob die Effekte des SDZ auf die Plasmidabundanz an der Wurzel durch die erhöhte mikrobielle Aktivität stärker ausfallen oder aufgrund der schnelleren Dissipation des SDZ sowie der höheren mikrobiellen Dichte abgeschwächt werden.

Des Weiteren sollten die Effekte eines Selektionsdrucks auf die Abundanz des einen Fitnessvorteil vermittelnden pHHV216-Plasmids in der Rhizosphäre dargestellt werden. In der Rhizosphäre konnten wir denselben Trend wie im nicht durchwurzelten Boden beobachten. In Anwesenheit von SDZ konnten wir eine Plasmidanreicherung, bei Abwesenheit von SDZ eine Plasmidabnahme innerhalb der Population detektieren.

Das experimentelle Design könnte in Zukunft dazu dienen, den von einem Antibiotikum verursachten Selektionsdruck im Boden einfach und reproduzierbar nachzuweisen.

Zusätzlich wurde ein Experiment durchgeführt, das zum Ziel hatte, die verschiedenen Wirte des Plasmids pHHV216 im Boden zu identifizieren, um seinen Wirtsbereich besser einzugrenzen. Es wurden potentielle Wirte aus verschiedenen *Beta*- und *Gamma*-Proteobakterien im Boden identifiziert.

3.4.2 Ergebnisse Wettbewerbsversuch

A. baylyi BD413-Zellen mit und ohne Plasmid pHHV216 wurden im gleichen Verhältnis in begüllten Boden appliziert, der SDZ-belastet war oder nicht. Über einen Versuchszeitraum von 28 Tagen wurden die Populationszahlen von *A. baylyi* sowie der Anteil der plasmidtragenden Fraktion untersucht.

Die Population von *A. baylyi* BD413 blieb bis zum Tag 28 ungefähr in der Höhe des Startinokulums von 10^6 Zellen/g Boden (Abbildung 15). Am Tag 28 gab es in den Kontrollbehandlungen des nicht durchwurzelten Bodens und in der Rhizosphäre einen Einbruch der Populationszahl um etwa eine Größenordnung (Daten vom nicht durchwurzelten Boden aus Jechalke *et al.* (2013a)).

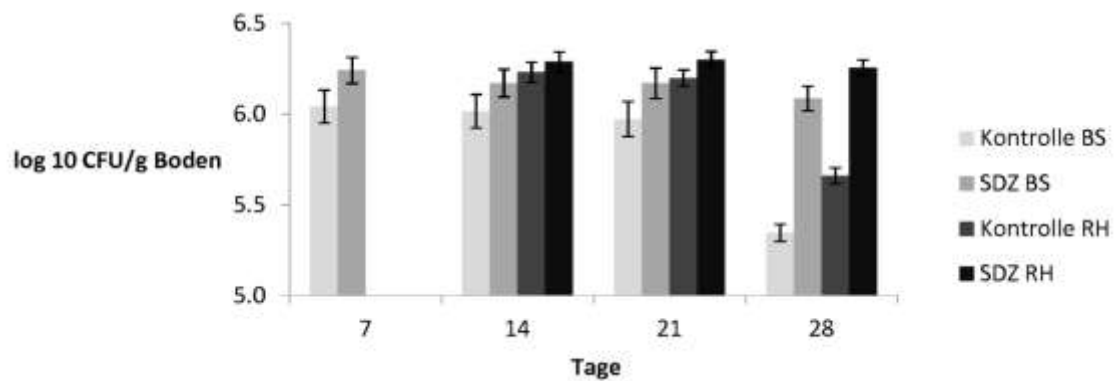


Abbildung 15: Log-transformierte koloniebildende Einheiten (CFU) pro Gramm Boden von *Acinetobacter baylyi* BD413 (Rif^r Kana^r miniTN5::*gfp-nptII*) im nicht durchwurzelter Boden (BS) und in der Rhizosphäre (RH) an den verschiedenen Beprobungstagen nach Versuchsbeginn. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung von fünf Replikaten.

Die Plasmidhaltigkeit der *A. baylyi* BD413-Population verhielt sich SDZ-abhängig. In den SDZ-Ansätzen stieg die Plasmidhaltigkeit im nicht durchwurzelter Boden um 14,8 % auf 64,8 % sowie in der Rhizosphäre um 20,2 % bis auf 70,2 % (Abbildung 15). Im Kontrollansatz fiel die Plasmidhaltigkeit im nicht durchwurzelter Boden um 11,4 % auf 38,6 % und in der Rhizosphäre um 6,2 % auf 43,8 %.

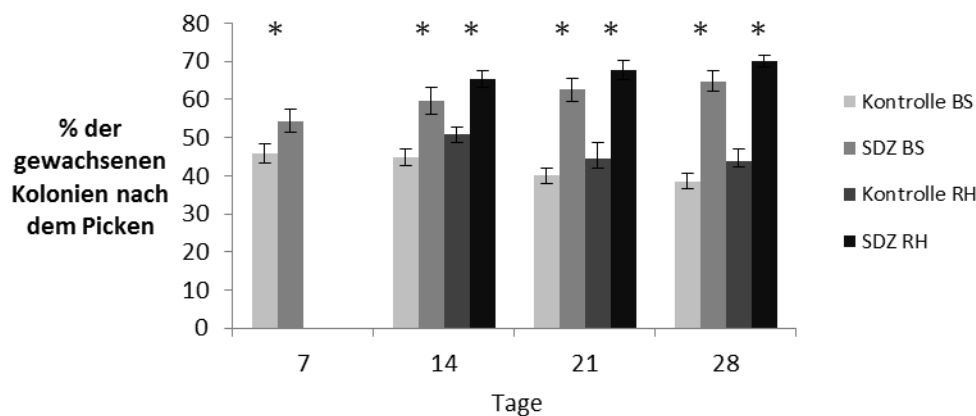


Abbildung 16: Anteil der plasmidtragenden *Acinetobacter baylyi* BD413 (Rif^r Kana^r miniTn5::*gfp-nptII*) im nicht durchwurzelter Boden (BS) und in der Rhizosphäre (RH) an den verschiedenen Beprobungstagen nach Versuchsbeginn. Signifikante Unterschiede zwischen den Ansätzen sind mit Sternchen markiert ($P < 0,05$, t-test). Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung von fünf Replikaten.

3.4.3 Selektionskoeffizient

Bei der Berechnung des Selektionskoeffizienten in der Rhizosphäre nach Lenski *et al.* (1991) war eine signifikante und lineare Selektionsrate ($P = 0,0117$, t-test, $n = 5$) zu verzeichnen, allerdings war der berechnete Selektionskoeffizient in der Rhizosphäre nicht signifikant ($P = 0,2177$, t-test, $n = 5$). Die Tendenz des Selektionskoeffizienten in der Rhizosphäre zeigte jedoch denselben Trend wie der für den nicht durchwurzelter Boden, der ebenfalls tendenziell negativ, aber nicht signifikant war.

3.4.4 Potentielle Wirte von pHHV216

Das Plasmid pHHV216 wurde via *E. coli* J53 in einen begüllten Boden inokuliert, um nach vier Wochen Bodenbakterien, die potentielle Wirte des Plasmids sind, über die Plasmidvermittelten Resistenzen zu isolieren und anschließend zu identifizieren. Um die Präsenz des Plasmids pHHV216 zu bestätigen, wurde aus 56 möglichen Transkonjuganten die Plasmid-DNA extrahiert und per Doppelverdau und Dot Blot-Hybridisierung identifiziert. Um auszuschließen, dass es sich bei den Isolaten um den Donorstamm oder um identische Isolate handelt, wurde die genomische DNA extrahiert und per BOX Muster-Amplifikation verglichen.

Nach Abgleich der Boxmuster sowie der Extrahierbarkeit der Plasmide blieb zur weiteren Bearbeitung eine Auswahl von 15 Transkonjuganten, deren BOX-Muster untereinander verschieden waren.

Nach erneuter Extraktion wurde die Plasmid-DNA der 15 Transkonjuganten einem Doppelverdau unterzogen und dann gegen eine *traN*-Sonde spezifisch für das pHHV216 hybridisiert.

Von den 15 getesteten Plasmiden hatten 11 ein identisches, mit der Positivkontrolle übereinstimmendes Restriktionsmuster (Abbildung 17, Bild links). Dieselben 11 Plasmide hybridisierten auch mit der *traN*-Sonde und konnten somit eindeutig als pHHV216-Plasmide identifiziert werden (Abbildung 16, Bild rechts).

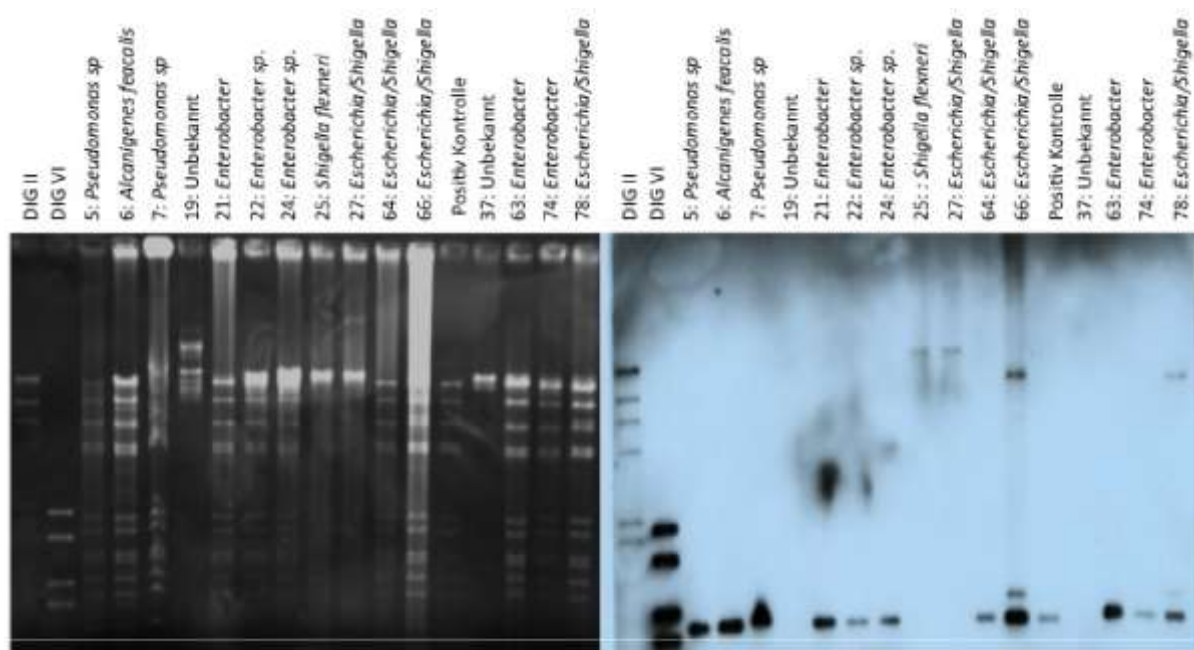


Abbildung 17: Das linke Bild zeigt das Doppelverdaumuster der aus den möglichen Transkonjuganten extrahierten Plasmid-DNA mit den Enzymen BstZ17I und PstI. Als Positivkontrolle wurde das pHHV216-Plasmid verwendet. Als Referenz wurden Größenmarker (Dig II + VI Ladder, Roche) verwendet. Das rechte Bild zeigt die Southern Blot-Hybridisierung der verdauten Plasmide nach Hybridisierung mit dem *traN*-Fragment des pHHV216-Plasmids.

Die genomische DNA der 11 Isolate wurde erneut extrahiert und aufgereinigt, um über Amplifikation des 16S rRNA-Gens mit anschließender Sequenzanalyse Aufschluss über die Identität der Transkonjuganten zu bekommen. Die amplifizierten 16S rRNA-Genfragmente der Transkonjuganten zeigten eine hohe Sequenzübereinstimmung mit der Klasse der *Beta*- und *Gamma*-Proteobakterien in der NCBI-Datenbank (Tabelle 4). Trotz mehrfacher Versuche war die Amplifikation der 16S rRNA-Fragmente mit anschließender Sequenzierung immer nur teilweise erfolgreich. Die erhaltenen 16S rRNA-Gensequenzen sind leider zu kurz, um eine eindeutige Identifizierung vornehmen zu können. Von den 6 Sequenzen, die laut NCBI blast eine hohe Übereinstimmung zu *E. coli* KO11 haben (TK Nr. 27, 63, 64, 66, 74 und 78), sind vier (TK Nr. 27, 64, 66 und 78) zu 99-100 % identisch mit der 16SrRNA-Sequenz des Donors (*E. coli* J53 1.ECJ53.1_43, whole genome shotgun sequence), während die Transkonjuganten Nummer 63 und 74 eine Übereinstimmung von weniger als 97 % aufweisen. Aufgrund der Sequenzdaten können wir nur bei den Transkonjuganten Nummer 63 und 74 ausschließen, dass es sich um den Donorstamm handelt.

Die 16S-Gensequenzen wurden in der europäischen Nukleotid-Bank archiviert. Die Accession Numbers der Sequenzen sind in Tabelle 4 aufgeführt.

TKNr.	BLAST HIT	ACC Nr.	MAX.IDENT.	COVERAGE
5	<i>Pseudomonas</i> sp. 91S1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	LM993944	99%	100%
6	<i>Alcanigenes faecalis</i> partial 16S rRNA gene, strain ADR44	LM993945	91%	100%
7	<i>Pseudomonas</i> sp. KW20 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	LM993946	99%	100%
21	<i>Enterobacter</i> sp. 18A 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	LM993947	99%	96%
22	<i>Enterobacter</i> sp. 18A 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	LM993948	99%	100%
25	<i>Shigella flexneri</i> strain E58 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	LM993949	100%	100%
27	<i>Escherichia coli</i> KO11, complete genome	LM993950	100%	100%
64	<i>Escherichia coli</i> KO11, complete genome	LM993953	99%	99%
66	<i>Escherichia coli</i> KO11, complete genome	LM993954	97%	99%
37	Unbekannt	LM993951		
63	<i>Escherichia coli</i> KO11, complete genome	LM993952	97%	100%
74	<i>Escherichia coli</i> KO11, complete genome	LM993955	99%	99%
78	<i>Escherichia coli</i> KO11, complete genome	LM993956	100%	100%

Tabelle 4: Ergebnisse der Sequenzanalyse der plasmidtragenden Isolate. Gezeigt sind die NCBI Blast-Ergebnisse mit höchster Sequenzidentität und Coverage sowie die Accession Numbers.

(TK Nr. = Nummer der Transkonjuganten; Acc. Nr. = Accession Nummer)

3.4.5 Diskussion

Der Stamm *A. baylyi* BD413 hat sich, wie in Heuer *et al.* (2009) beschrieben, als stabiler Wirt des Plasmids pHHV216 bestätigt. Er stammt ursprünglich von dem *Acinetobacter* BD4-Stamm ab, der von Juni & Janik (1969) als „klassisches“ Bodenbakterium mit der Fähigkeit zur Pilzbildung beschrieben wurde, die bei der natürlichen Transformation von Bedeutung ist. Der hier verwendete Stamm konnte auch unter Bodenbedingungen freie DNA aufnehmen und über homologe Rekombination in das Genom integrieren (Gebhard & Smalla, 1998).

Die Zahlen der koloniebildenden Einheiten (CFU) von *Acinetobacter* BD413 lagen im Versuchszeitraum ansatzunabhängig im Bereich des Startinokulums (10^6 Zellen/g Boden), was darauf hinweist, dass der *Acinetobacter*-Stamm im Boden und in der Rhizosphäre persistieren kann. Der Populationseinbruch in der Kontrollrhizosphäre sowie in der Kontrolle des nicht durchwurzeltens Bodens (Kontroll-Bulk Soil) am Tag 28 ist möglicherweise ein Artefakt, bedingt durch Feuchtigkeitsschwankungen aufgrund der manuellen Bewässerung der Versuchsansätze oder auch durch Änderungen des Entwicklungsstadiums der Pflanze. So ist bekannt, dass die Zusammensetzung der Wurzelexsudate, die die bakterielle Aktivität beeinflussen kann, abhängig ist von der Art und dem Entwicklungsstadium der Pflanze, dem Bodensubstrat sowie von Stressfaktoren (Doornbos *et al.*, 2012). Dies müsste durch

eine Wiederholung des Experiments verifiziert werden. Im Boden herrschen üblicherweise oligotrophe Verhältnisse, die zu einem relativ geringen Bakterienwachstum führen. Durch Gülle und Wurzelexsudate zugeführte Nährstoffe hingegen können die Aktivität der bakteriellen Gemeinschaft stimulieren und somit den Effekt des bakteriostatisch wirkenden SDZ steigern.

So führte Selektionsdruck in dieser Studie zur Anreicherung der das Plasmid pHHV216 tragenden *A. baylyi*-Population in der Rhizosphäre um ca. 20 % nach 28 Tagen, während bei nicht vorhandenem Selektionsdruck der Anteil um ca. 8 % abnahm (Abbildung 16). Diese Anreicherung war signifikant für die einzelnen Zeitpunkte. Dies deutet darauf hin, dass das Plasmid pHHV216 der *A. baylyi*-Population einen Fitnessvorteil bei SDZ-Selektionsdruck vermittelte, so dass der Anteil der plasmidtragenden Population rechnerisch um 0,7 % täglich angereichert wurde. Dies ist derselbe Trend, wie er bereits bei einer vorherigen Arbeit im nicht durchwurzelter Boden beschrieben wurde (Jechalke *et al.*, 2013a), allerdings war der Selektionskoeffizient bei dieser Arbeit nicht signifikant, vermutlich bedingt durch die geringe Zahl an gemessenen Zeitpunkten. Zusätzlich konnten Brandt *et al.* (2009) zeigen, dass die Zugabe von künstlichen Wurzelexsudaten die SDZ-Toleranz von Bodenbakterien erhöht, was in diesem Experiment in der Rhizosphäre ebenfalls zu einer Abschwächung des SDZ-Effekts geführt haben könnte. Rosendahl *et al.* (2011) beschrieben eine erhöhte Dissipation des SDZ in der Rhizosphäre im Vergleich zum nicht durchwurzelter Boden, was zu einer geringeren Halbwertszeit des Antibiotikums führte. So wurde das SDZ-abbauende Bakterium *Microbacterium lacus* aus begültem Boden isoliert und eine Anreicherung von einer „operational taxonomic unit“ (OTU) mit naher Verwandtschaft in SDZ-behandeltem Boden festgestellt (Tappe *et al.*, 2013, Ding *et al.*, 2014). Ein weiterer Grund für den abgeschwächten SDZ-Effekt könnte neben der geringeren Konzentration von SDZ die höhere Dichte der Bakterienpopulation in der Rhizosphäre sein, bedingt durch erhöhten Nährstoffeintrag durch Wurzelexsudate, die die Dosis-Wirkung-Beziehung bei der konzentrationsabhängigen Effektivität des SDZ negativ beeinflusst. Auch gibt es Hinweise, dass die Pflanzen einen geringen Teil der Antibiotika und deren Metabolite in sich aufnehmen (Kang *et al.*, 2013, Mathews & Reinhold, 2013) sowie ein Teil der Antibiotika, die an der Oberfläche vorliegen, durch Photodegradation zerstört wird. Allerdings scheinen diese Mengen vernachlässigbar klein zu sein (Jechalke *et al.*, 2014), so dass sie keinen gravierenden Effekt auf diese Ergebnisse haben sollten.

Bei der Suche nach potentiellen Wirten des Plasmids pHHV216 erfolgte der Ausschluss des Donors über die Auxotrophie des *E. coli* J53 Donorstammes. Zudem wurde in einem vorhergehenden Experiment außerhalb dieser Arbeit gezeigt, dass das pHHV216-Plasmid nicht stabil in *E. coli* J53 repliziert (Diplomarbeit Christoph Kopmann). Darüber hinaus zeigen uns die Ergebnisse der 16S rRNA-Sequenzanalyse, dass es sich bei den Transkonjuganten Nr. 63 und 74 definitiv nicht um den Donorstamm handelt, während bei den anderen vier Isolaten mit *E. coli* KO11-ähnlichen Sequenzen diese Sequenzen zu kurz waren, um diesen Ausschluss vornehmen zu können. Die Ergebnisse zum Donorausschluss sind nicht eindeutig und bedürfen weiterer Untersuchungen.

Als potentielle Wirte des pHHV216-Plasmids konnten in dieser Studie verschiedene mit *Pseudomonas* sp., *Kerstersia*, *Enterobacter* sp., *Escherichia* sowie *Shigella* assoziierte Isolate identifiziert werden. Diese Gattungen gehören alle zu den Klassen der *Beta*- und *Gamma*-Proteobakterien. Dies ist ein Hinweis dafür, dass das „Low GC-Plasmid“ pHHV216 in diesen Klassen persistieren und replizieren kann. Unter den gefischten potentiellen Wirten befanden sich keine Isolate mit Sequenzähnlichkeit zu humanpathogenen Stämmen - bis auf das *Shigella flexneri*-Isolat. Die Vier Mitglieder der Gattung *Shigella* sind alle medizinisch relevant, da sie Shigellosen (Bakterienruhr) verursachen können. In einer Studie außerhalb dieser Arbeit (Diplomarbeit Christoph Kopmann) wurde der Wirtsbereich des pHHV216-Plasmids mit einem ähnlichen Experiment untersucht. Dabei wurde das pHHV216-Plasmid auch aus Isolaten der Alpha-Proteobakterien (*Rhodobacter sphaeroides*) sowie aus dem Phylum Bacteroidetes (*Chryseobacterium* sp.) zurückisoliert. Dies deutet darauf hin, dass der Wirtsbereich des Plasmids größer ist als die Ergebnisse dieses Experimentes nahelegen.

Das Prinzip der Co-Selektion beschreibt die Anreicherung verschiedener Antibiotikaresistenzen über einen einzelnen Selektionsdruck (Baker-Austin *et al.*, 2006). Dabei wird z.B. ein Plasmid, das über eine Antibiotikaresistenz verfügt, durch den entsprechenden Selektionsdruck angereichert. Befinden sich auf diesem Plasmid weitere Antibiotikaresistenzgene, werden sie mit angereichert. In unserem Fall setzten wir über das SDZ einen Selektionsdruck, der das Plasmid pHHV216, das das *sul2*-Resistenzgen trägt, anreichert. Gleichzeitig werden dabei vier weitere Antibiotikaresistenzgene (*strAB* = Streptomycinresistenz, *tetH* = Tetrazyclinresistenz, *florR* = Chloramphenicolresistenz, *aacC2* = Gentamycinresistenz), die auf dem Plasmid lokalisiert sind, angereichert. Dies potenziert das Problem der Verbreitung von Antibiotikaresistenzen durch Eintrag von Antibiotika in die Umwelt.

Kürzlich konnte gezeigt werden, dass Antibiotikaresistenzgene einiger „Krankenhauskeime“ dieselbe Nukleotidsequenz aufwiesen wie Resistenzgene von Bodenbakterien (Forsberg *et al.*, 2012). Dies ist ein Hinweis dafür, dass es eine Verbindung zwischen dem Resistom von menschen- und umweltassoziierten Bakterien gibt. Da sich die Resistenzgene häufig auf mobilen genetischen Elementen befinden und diese bei Kontakt einfach in verwandte Bakterienstämme transferieren und dort repliziert werden können, ist eine Verbreitung der Resistenzgene im menschlichen Mikrobiom möglich und wahrscheinlich. Das Plasmid pHHV216 ist in seiner genetischen Struktur, wie bei vielen Plasmiden beobachtet, zweigeteilt. Neben der relativ stabilen „Backbone“-Region, die alle zur Replikation und zum Transfer des Plasmids notwendigen Gene enthält, besitzt pHHV216 eine variable akzessorische Region, die verschiedene Signalsequenzen für den HGT (ISCR, Transposons) und Antibiotikaresistenzgene trägt (Heuer *et al.*, 2009). Diese Signalsequenzen dienen dem HGT, allerdings ermöglichen sie die partielle Transferierung von Plasmidfragmenten und erhöhen somit das Potential des Plasmids, Resistenzgene ins menschliche Mikrobiom zu transferieren.

Die Verbreitung des pHHV216-Plasmids innerhalb der *Beta*- und *Gamma*-Proteobakterien und somit ein möglicher Transfer zum menschlichen Mikrobiom und zu humanpathogenen Stämmen ist denkbar. Dies könnte zur Verbreitung multiresistenter Keime beitragen und somit den erfolgreichen Einsatz von Antibiotika in der Humanmedizin bedrohen.

Folglich müssen bei der Risikobewertung zum Eintrag von Antibiotika in die Umwelt die Co-Selektion sowie die Transferabilität der Resistenzgene über mobile genetische Elemente stärker berücksichtigt werden.

Weiterführende Experimente mit diesen aus dem Boden isolierten Wirten des pHHV216-Plasmids sind notwendig, um deren Verhalten im nicht durchwurzelten Boden und in der Rhizosphäre zu verstehen und mögliche Risiken für die menschliche Gesundheit besser abschätzen zu können.

3.4.6 Fazit

Was war bekannt?

Unter SDZ-Selektionsdruck vermittelt das Plasmid pHHV216 im nicht durchwurzelten Boden der *Acinetobacter*-Population einen signifikanten Fitnessvorteil, und deshalb nimmt der Anteil Plasmid-tragender *Acinetobacter*-Zellen zu.

Das Plasmid pHHV216 persistiert stabil in *Acinetobacter baylyi*, während es in *E. coli* nicht stabil persistiert.

Was ist neu?

Das Plasmid hat das Potential, die SDZ-Resistenz innerhalb der *Acinetobacter*-Population in der Rhizosphäre zu vermitteln.

Auch in der Rhizosphäre wird das Plasmid innerhalb der *Acinetobacter*-Population angereichert, vermutlich aufgrund der Selektionsdruck vermindernenden Rhizosphären-effekte allerdings nicht signifikant.

Als potentielle Wirte des pHHV216-Plasmids konnten in dieser Studie verschiedene mit *Pseudomonas* sp., *Kerstersia*, *Enterobacter* sp., *Escherichia* sowie *Shigella* assoziierte Isolate identifiziert werden.

Was fehlt?

Ist es die geringere SDZ-Konzentration in der Rhizosphäre oder gibt es andere Rhizosphäreneffekte, die die Anreicherung des Plasmidtragender *Acinetobacter*-Zellen abschwächt, so dass die Anreicherung im Vergleich zum nicht durchwurzelten Boden nicht signifikant ist?

Diese Ergebnisse sind spezifisch für das pHHV216-Plasmid in einer *Acinetobacter*-Population in einer im Merzenhausener Boden wachsenden Maisrhizosphäre unter SDZ-Selektionsdruck. Inwieweit lassen sich diese Ergebnisse auf andere resistenzvermittelnden Plasmide, andere Wirte, andere Pflanzen, andere Antibiotika in anderen Böden übertragen, um daraus ein einfaches universelles Werkzeug zum Nachweis von Selektionsdruck in der Rhizosphäre zu entwickeln?

Es konnten weitere mögliche native Wirte des pHHV216-Plasmids im Boden gefunden werden, allerdings müssten einerseits die Transferexperimente durch Wiederholungen verifiziert werden, andererseits fehlen Stabilitätsstudien, um zu beweisen, dass das Plasmid pHHV216 nicht nur in diese Isolate transferiert, sondern dort auch stabil persistiert.

Wie konnte der auxotrophe *E. coli*-Donorstamm vier Wochen im Boden persistieren?

Bei der Aussortierung der doppelten Transkonjuganten durch die Box-Profile hätte der Donorstamm mitgeführt werden müssen.

Kamen die drei möglichen *E. coli*-Transkonjuganten (deren 16S rRNA-Sequenz nicht der des Donors entsprach) aus der Gülle? Und was hat ihr Überleben über vier Wochen im Boden ermöglicht?

4 Abschließende Diskussion

4.1 Die Gülle als Vektor von Antibiotika und resistenten Bakterien in landwirtschaftlich genutzten Flächen

Es gehört zur guten landwirtschaftlichen Praxis, die anfallenden Tierexkreme in Form von Gülle auf landwirtschaftlich genutzte Felder auszubringen. Der Landwirt nutzt somit das Nebenprodukt Gülle zur Düngung seiner Felder und muss sich nicht mehr um die Entsorgung der Gülle kümmern.

In den 1980er Jahren hat man angefangen zu verstehen, dass die stark wachsende Tierhaltung zu immer größeren Güllemengen führte, die zu einer Überdüngung der Felder mit Stickstoff mit anschließender Belastung des Grundwassers führten. Man hat daraufhin die Menge an Gülle, die pro Jahr auf einen Hektar ausgebracht werden darf, begrenzt.

Seit ca. Anfang der 1990er Jahre gibt es in der Humanmedizin ein wachsendes Problem mit gegen Antibiotika resistent gewordenen humanpathogenen Bakterien, die den therapeutischen Fortschritten der Antibiotikaaanwendung beim Menschen zunehmend entgegnen (Ashelford *et al.*, 2003).

Woher kommen diese Antibiotikaresistenzen, wie verbreiten sie sich und warum nimmt ihre Abundanz so schnell zu?

Wenn ein Selektionsdruck auf eine bakterielle Gemeinschaft trifft, kann das die Mobilisierung entsprechender Resistenzgene oder eine Anreicherung der entsprechenden Resistenzgene in der mikrobiellen Gemeinschaft bewirken. Mikrobielle Bodengemeinschaften stellen an sich ein Reservoir für unbekannte Resistenzgene dar, da sie Antibiotika selber produzieren, um sich Selektionsvorteile zu verschaffen oder um mit ihnen zu kommunizieren (Davies *et al.*, 2006). Sie sind zudem schwer zu finden, da sie in Subpopulationen bei nicht vorhandenem Selektionsdruck in geringen Abundanzen überdauern können (Heuer & Smalla, 2012).

In der Regel breitet sich die Anreicherung eines Resistenzgens bei gesetztem Selektionsdruck horizontal und vertikal innerhalb der Gemeinschaft aus. Vertikal bedeutet, dass das bereits resistente Bakterium einer Population mit seinen resistenten Nachkommen einen Vorteil gegenüber dem sensitiven Bakterium derselben Population hat.

Horizontal bedeutet, dass sich die Resistenzgene via HGT über Art- und Populationsgrenzen hinweg verbreiten können (siehe Kapitel 1). Als potenzierender Faktor bei Anreicherung von Resistenzgenen in der Umwelt ist das Phänomen der Co-Selektion nicht außer Acht zu lassen. Bei der Co-Selektion können durch einen gesetzten Selektionsdruck mehrere verschiedene Resistenzgene gleichzeitig

angereichert werden, indem das entsprechende Resistenzgen auf einem mobilen genetischen Element mit anderen Resistenzgenen co-lokalisiert ist. Innerhalb dieses Projektes wurde eine neue Gruppe, die „Low GC-Plasmide“ gefunden, die bis zu Fünf verschiedene Antibiotikaresistenzen trugen und als Vektor der SDZ-Resistenz in Gülle und Boden identifiziert wurden (Heuer *et al.*, 2009). Ein Vertreter dieser neuen Klasse ist das Plasmid pHHV216, das vollständig sequenziert wurde. Bei SDZ-Selektionsdruck verbreitete sich die SDZ-Resistenz in den bakteriellen Gemeinschaften in unseren Experimenten maßgeblich mit Hilfe der „Low GC-Plasmide“, was zur potentiellen Co-Selektion verschiedener Resistenzgene innerhalb der bakteriellen Gemeinschaften führte.

Resistenzgenanreicherung bei Bakterien in der Umwelt findet in geringem Maße immer statt, da man davon ausgehen kann, dass Selektionsvorteil bietende Gene, so ihr Vorteil nicht gebraucht wird, zwar innerhalb der Gemeinschaft sowie Population ausgedünnt werden, aber in geringen Abundanzen weiterhin persistieren (Heuer & Smalla, 2012). Resistenzgenanreicherung wird allerdings durch Selektionsdruck maßgeblich potenziert, z.B. durch den Kontakt von Antibiotika-belasteten Abwässern oder Gülle mit bakteriellen Gemeinschaften im Boden.

In dieser Doktorarbeit wurden die Effekte von Antibiotika aus Schweinegülle (Lamshöft *et al.*, 2010) auf die landwirtschaftlich genutzten Flächen untersucht. Als Modell-Antibiotikum wurde SDZ ausgewählt, da es seit den 1940er Jahren eingesetzt wird und eines der in der Veterinärmedizin am häufigsten verwendeten Antibiotika ist, insbesondere in der Schweineproduktion (Burkhardt *et al.*, 2005, Sarmah *et al.*, 2006).

Die Fleischproduktion sowie die Anwendung von Antibiotika in der Veterinärmedizin sind seit den 1940er Jahren stetig gestiegen. Die industrielle Tierproduktion in der westlichen Welt verbraucht große Mengen Antibiotika. Im Jahr 2013 wurden allein in Deutschland 1452 Tonnen Antibiotika an Veterinärmediziner abgegeben (BVL, 2013), während in der Humanmedizin eine um ein Vielfaches geringere Menge Verwendung fand.

Abhängig von der Tierart und dem Antibiotikum konnte gezeigt werden, dass große Mengen der verabreichten Antibiotika die Tiere passieren und als unmodifizierte Substanz bzw. als biologisch aktive Metabolite wieder ausgeschieden wurden (Boxall *et al.*, 2004, Sarmah *et al.*, 2006). Heuer *et al.* (2008b) hat aufgezeigt, dass das

Schweinen oral verabreichte und radioaktiv markierte SDZ innerhalb von 10 Tagen zu 96 % wieder ausgeschieden wurde. Das SDZ verließ die Schweine zum großen Teil unmodifiziert, allerdings wurden auch geringe Mengen zweier Metabolite detektiert, das 4-OH-SDZ und das N-Ac-SDZ. In der Regel wird die Gülle in großen Tanks gelagert, bevor sie ausgebracht wird. Lamshöft *et al.* (2010) untersuchten die Stabilität des ¹⁴C-markierten SDZ und seiner Metabolite während der Lagerung und kamen zu dem Ergebnis, dass das SDZ während der Lagerung stabil bleibt und sogar ansteigt, da ein Teil des N-Ac-SDZ-Metabolits wieder in die Ausgangssubstanz transformiert wird.

Durch das Ausbringen von Gülle als Dünger oder auf direktem Wege durch Ausscheidungen von grasenden Tieren gelangen beachtliche Mengen SDZ auf landwirtschaftlich genutzte Flächen (Jechalke *et al.*, 2014). Das SDZ kann im Boden überdauern; obwohl es schnell aus der bioverfügbaren-EAS Fraktion verschwindet, gibt es einen konstanten Fluss aus der RES, der nicht bioverfügbaren Bodenfraktion in die EAS-Fraktion. Die RES-Fraktion von SDZ hat eine Halbwertszeit von 330 Tagen, so dass SDZ nach Applikation auf dem Feld über lange Zeit in subinhibitorischen Konzentrationen bioverfügbar freigesetzt wird. Es gibt immer mehr Hinweise darauf, dass Antibiotika auch in subinhibitorischen Konzentrationen einen Einfluss auf die Struktur von bakteriellen Gemeinschaften haben (Heuer & Smalla, 2007, Gullberg *et al.*, 2011).

Daher kann vermutet werden, dass der Eintrag von Antibiotika, Nährstoffen und transferable Antibiotikaresistenzen tragende Bakterien, durch die Gülle, zur Antibiotikaresistenzverbreitung beitragen. In welchem Maß lässt sich schwer sagen, allerdings wurde gezeigt, dass SDZ, auch in subinhibitorischen Konzentrationen mit Schweinegülle inokuliert, die Abundanz von *sul*-Genen sowie die Transferabilität der Resistenzgene kurzzeitig erhöht.

Die daran beteiligten Prozesse sind komplex und bisher wenig verstanden. Im Folgenden werden die bisherigen u.a. in der DFG-Forschergruppe 566 gewonnenen Erkenntnisse zum Schicksal und zu den Effekten von SDZ im Boden zusammengefasst.

Der Verbleib von Sulfadiazin im nicht durchwurzelten Boden

Gelangen Antibiotika über die Gülle in den Boden, befinden sie sich in der sogenannten Bodenlösung, wo sie mit den Bakterien und Bodenpartikeln interagieren (siehe Abbildung 18).

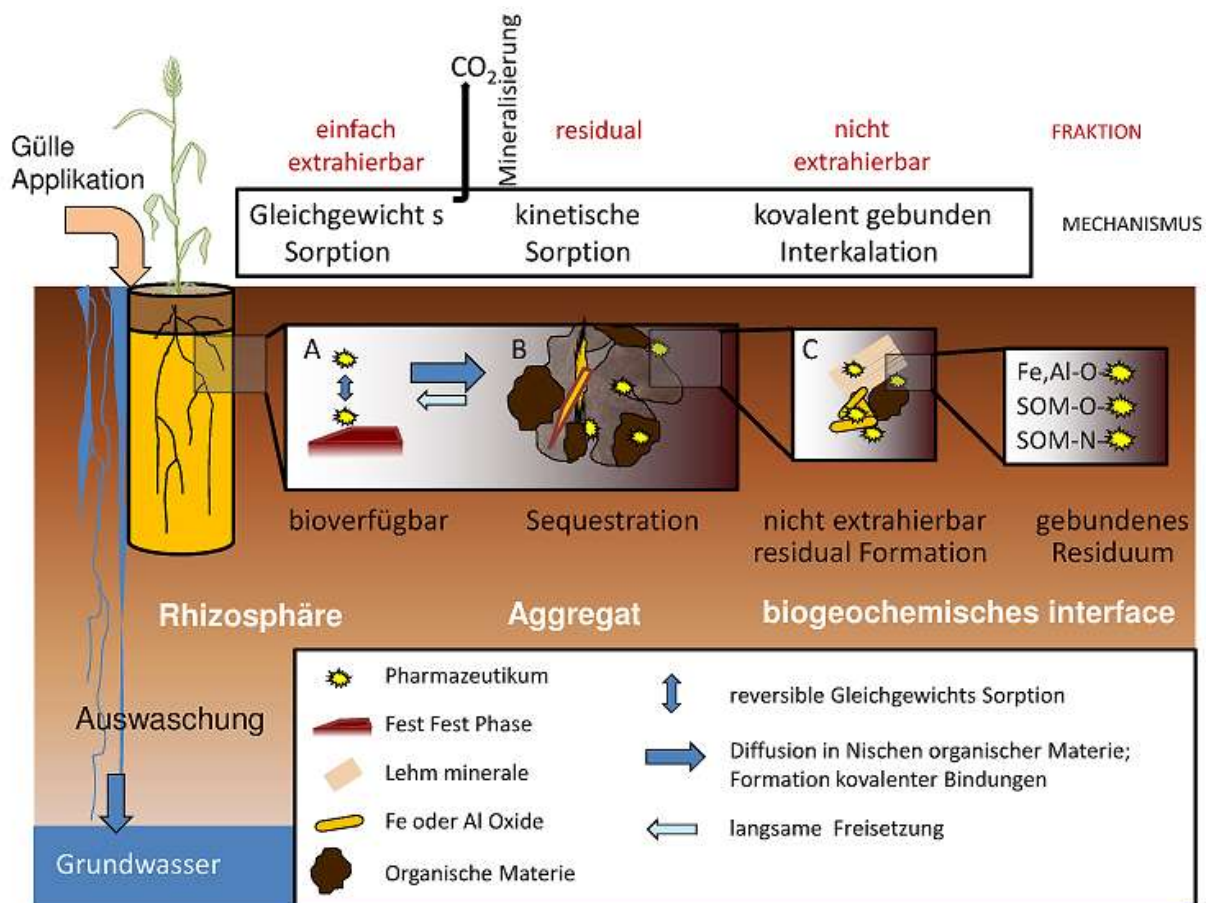


Abbildung 18: Der Verbleib von Antibiotika im Boden. Die Interaktion mit der Bodenfestphase durch Sorptionsreaktionen und Biotransformationen bestimmen maßgeblich den Verbleib des Antibiotikums. Die bioverfügbare Fraktion **(A)** umfasst ungelöste und reversibel sorbierte Antibiotika. Diese Fraktion ist einfach zu extrahieren mit milden Extraktanten wie z.B. einer verdünnten Salzlösung. Sequestration **(B)** reduziert die Antibiotika der Bioverfügbarkeit und reduziert ihre Dissipation durch kinetische Sorption und Diffusion in Nischen der organischen Materie, Mineralien und Mikroaggregate. Sequestrierte Antibiotika können z.T. durch harsche Extraktionsmethoden, hoher Druck und hohe Temperaturen re-extrahiert werden (Residual Fraktion). Die sequestrierten Residuen können langsam zurück in die bioverfügbare Fraktion freigesetzt werden. Die irreversible Einlagerung in Nanoporen sowie die Formation von kovalenten Bindungen führt zur Bildung der nicht extrahierbaren Fraktion **(C)**, modifiziert nach Jechalke *et al.* (2013b).

Einige Antibiotika, z.B. SDZ, haben das Potential, aus der Bodenlösung durch Bodenkapillaren und/oder Auswaschung in tiefere Schichten bis hin zum Grundwasser zu gelangen (Hamscher *et al.*, 2005, Aust *et al.*, 2010). Der weitaus größte Teil bleibt aber in den oberen Bodenschichten erhalten und führt dort über Sorptionsprozesse zunächst zu einer Anreicherung von SDZ. In dieser Phase ist die Substanz noch biologisch verfügbar, da sie einfach in Lösung zu bringen ist. Mit steigender Kontaktzeit des Antibiotikums im Boden sinkt die Bioverfügbarkeit ständig, da sekundäre Sorptionsreaktionen sowie Diffusionsreaktionen dafür sorgen, dass es einen konstanten Fluss in die gebundene Phase gibt (Förster *et al.*, 2009, Zarfl *et al.*, 2009). Dieser Prozess ist durch kinetische Sorption, bei der Polarität, pH-Wert sowie Teilladungen der Moleküle maßgeblich eine Rolle spielen, bedingt (ter Laak *et al.*, 2006a, b, Figueroa-Diva *et al.*, 2010, Srinivasan *et al.*, 2013). So konnte z.B. gezeigt werden, dass die Sorption des Sulfonamids Sulfamethoxazol bei Flächen, die über einen längeren Zeitraum mit unbehandeltem Abwasser behandelt worden waren, herabgesetzt war, da wahrscheinlich die hoch affinen Sorptionsbindstellen saturiert waren (Dalkmann *et al.*, 2014).

Ist das Molekül in der gebundenen Phase angekommen, spricht man davon, dass es in die RES-Fraktion des Bodens übergegangen ist. Der Terminus der einfach zu extrahierenden Fraktion (EAS) stammt aus der ökologischen Chemie und beschreibt den Teil des Stoffes, der mit einer CaCl_2 Fest-Flüssig-Extraktion aus dem Boden re-extrahiert werden kann (Förster *et al.*, 2009, Zarfl *et al.*, 2009). Leider ist diese Einteilung nicht gleichzusetzen mit der Bodenlösung, da auch ein unbestimmter Teil der RES mit extrahiert wird und wahrscheinlich ein Teil der Bodenlösung nicht mit extrahiert wird (Rosendahl *et al.*, 2011). In dieser Arbeit nutzen wir die EAS-Fraktion als Maß für die Bioverfügbarkeit eines Antibiotikums, da es noch keine genauere Definition dieser beiden Fraktionen gibt bzw. noch keine Extraktionsmethode, die ausschließlich die Bodenlösung erfasst.

Den Prozess, bei dem sich das Molekül in die RES begibt, nennt man Sequestration. Er beschreibt einerseits die Detoxifizierung des Bodens, da die Moleküle nicht mehr bioverfügbar sind, andererseits aber auch die Einlagerung und Erhaltung der Moleküle im Boden. Diese Sequestration ist keine Einbahnstraße, da es wie von Rosendahl *et al.* (2011) gezeigt, eine geringe, aber konstante Freisetzung des SDZ aus der RES-Fraktion zurück in die Bodenlösung gibt (Rosendahl *et al.*, 2011). In der RES-Fraktion kommt es auch, enzymatisch katalysiert, zur Ausbildung von kovalenten Bindungen (Bialk *et al.*, 2007, Gulkowska *et al.*, 2013) sowie durch

diffusionsbedingte Prozesse zur Einlagerung der Moleküle in Nischen, wo sie keinen Kontakt mehr zur Bodenlösung haben (Pignatello & Xing, 1996, Nowara *et al.*, 1997). Junge *et al.* (2011) konnten z.B. aufzeigen, dass SDZ, das sich im Boden an häufig vorkommende Huminsäuren bindet, nicht re-extrahierbar ist.

Diesen Teil der RES nennt man auch nicht extrahierbar, da man diese Moleküle selbst mit den harschesten Extraktionsmethoden nicht zurückgewinnen kann.

Es gibt noch andere detoxifizierende Prozesse im Boden und an der Bodenoberfläche, allerdings sind diese vom Ausmaß so gering, dass sie hier nur kurz Erwähnung finden.

Evaporation der pharmazeutischen Moleküle ist nahezu auszuschließen, da der Dampfdruckpunkt dieser Moleküle naturgemäß zu hoch ist.

Die Mineralisierung der Antibiotika durch Mikroorganismen findet statt, beträgt aber bei den meisten Antibiotika weniger als 2 % (Förster *et al.*, 2009, Junge *et al.*, 2011, Junge *et al.*, 2012).

Die Aufnahme von einigen Antibiotika durch die Pflanze ist ebenfalls bestätigt worden (Boxall *et al.*, 2006, Hu *et al.*, 2010, Eggen *et al.*, 2011, Kang *et al.*, 2013), allerdings waren die gemessenen Konzentrationen so gering, dass sie wahrscheinlich keinen maßgeblichen Detoxifizierungsweg des Bodens darstellen (Rosendahl *et al.*, 2011, Rosendahl *et al.*, 2012).

So divers die chemischen Strukturen und die dadurch bedingten physiko-chemischen Eigenschaften der verschiedenen Antibiotika sind, so divers sind die Sequestration und Sorptionsreaktionen und -raten, was in unterschiedlichen Antibiotika-Halbwertzeiten (DT_{50}) resultiert. β -Lactame z.B. werden hydrolytisch oder biologisch, abhängig von der Bodenfeuchte (Braschi *et al.*, 2013), innerhalb von Stunden abgebaut und sind deshalb nur in geringen Konzentrationen in der Umwelt zu finden. Die Halbwertzeiten von SDZ betragen im Mittel in der einfach zu extrahierenden Fraktion 2-10 Tage und in der RES 330 Tage, was zusätzlich von der Bodenfeuchte beeinflusst wird (Rosendahl *et al.*, 2011).

Überschreitet der Eintrag der Antibiotika ihre Dissipationsraten im Boden, kann es dort einer Akkumulation kommen. So konnten Dalkmann *et al.* (2012) eine Akkumulation von Ciprofloxacin und Sulfamethoxazol in mexikanischem Boden, der über 20 Jahre mit unbehandeltem Abwasser bewässert wurde, nachweisen.

Als letztes sei hier erwähnt, dass die Antibiotikaverteilung im Boden nicht homogen ist und eher in sogenannten „hot spots“ strukturiert auftritt. Das heißt, dass wir bei

den chemischen Analysen zur Konzentrationsbestimmung von Antibiotika im Boden, bei denen relativ große Mengen an Boden nötig sind, immer nur einen Mittelwert sehen und nicht die Konzentrationen, denen Bakterien an „hot spots“ mit hoher Antibiotikakonzentration ausgesetzt sind.

4.2 Der Verbleib von Sulfadiazin in der Rhizosphäre

Die meisten Studien, die sich mit dem Verbleib von Antibiotika in landwirtschaftlich genutzten Flächen beschäftigen, behandeln meistens nur den nicht durchwurzelter Boden. Da die landwirtschaftlich genutzten Flächen nahezu ausnahmslos bepflanzt sind, ist die Rhizosphäre als Faktor zur Bewertung des Verbleibs und Effekts von Antibiotika notwendig.

Die Rhizosphäre ist als Boden, der durch die Wurzel beeinflusst wird, definiert und unterscheidet sich deswegen in vielfacher Hinsicht vom nicht durchwurzelter Boden (van Elsas *et al.*, 2003).

Es gibt einen zusätzlichen Nährstoffeintrag in diesem Kompartiment, der durch die Wurzelexsudation der Pflanzen gewährleistet ist. Dies hat Auswirkungen auf die Zusammensetzung der bakteriellen Gemeinschaft sowie ihre metabolische Aktivität und die Zelldichte in diesem Kompartiment (Kroer *et al.*, 1998, van Elsas *et al.*, 2003, Ding & He, 2010) und beeinflusst auch den horizontalen Gentransfer.

Brandt *et al.* (2009) haben gezeigt, dass die Sensitivität der bakteriellen Bodengemeinschaft gegenüber SDZ nach Zugabe von künstlichen Wurzelexsudaten in Form von Kohlenstoffsubstraten sinkt, was die Autoren als ein Wachstum von SDZ-resistenten oder SDZ-toleranten Bakterien diskutierten. Im Rahmen dieser Doktorarbeit konnte im Feldversuch festgestellt werden, dass die Konzentration des SDZ aus der CaCl_2 -Fraktion in der Maisrhizosphäre schneller sinkt als im nicht durchwurzelter Boden, was wahrscheinlich durch eine schnellere Biodegradation des SDZ in der Rhizosphäre zu begründen ist (Rosendahl *et al.*, 2011, Kopmann *et al.*, 2013, Reichel *et al.*, 2013). Eine andere Studie hat aufgezeigt, dass durch unterschiedliche Bepflanzung eines mit Antibiotika belasteten Bodens sich die Konzentrationen des Antibiotikums im Boden pflanzenspezifisch verhalten (Li *et al.*, 2011). Dies könnte bedingt sein durch eine pflanzenspezifische Zusammensetzung und Funktion der bakteriellen Gemeinschaft in der Rhizosphäre (Berg & Smalla, 2009). Weiterhin konnte festgestellt werden, dass Unterschiede bei der Aufnahme von Substanzen in die Pflanze sowie bei der Bioakkumulierung von Substanzen durch die Pflanze zu pflanzenspezifischen Effekten der Antibiotika auf die bakterielle Gemeinschaft in der Rhizosphäre führen (Boxall *et al.*, 2006).

Wie bereits erwähnt, ist die Aufnahme von Antibiotika durch die Pflanze sehr gering (Kang *et al.*, 2013, Mathews & Reinhold, 2013) und der Effekt der Pflanze auf die RES (sequestriert und somit nicht bioverfügbar) des SDZ sehr gering, wenn überhaupt messbar (Rosendahl *et al.*, 2011, Kopmann *et al.*, 2013). Die schnellere Dissipation des SDZ aus der CaCl_2 -Fraktion der Rhizosphäre konnte in dieser

Doktorarbeit mit geringeren Abundanzen von *sul1*- und *sul2*-Genen relativ zu 16S rRNA-Genen korreliert werden (Jechalke *et al.*, 2013c, Kopmann *et al.*, 2013). Niedrige Konzentrationen des SDZ (<5 µg/kg) konnten während der gesamten Dauer des Feldversuches gemessen werden. Es gibt genügend Hinweise, dass Antibiotika in subinhibitorischen Konzentrationen Einfluss auf die Genexpression von Bakterien nehmen sowie in bakteriellen Gemeinschaften als Signalmoleküle dienen können (Davies *et al.*, 2006, Martinez, 2009, Davies & Davies, 2010). Die genaueren Zusammenhänge zwischen den geringen, aber konstanten Konzentrationen des SDZ in der EAS auf das Bodenmikrobiom sind noch nicht gut erforscht und bedürfen weiterer Untersuchungen. Ebenfalls sind die Effekte des in der Pflanze akkumulierten SDZ auf das pflanzenassoziierte Mikrobiom, Resistom und Mobilom noch nicht bekannt und bedürfen weiterer Forschung.

Phytotoxische Effekte von Antibiotika wurden von verschiedenen Pflanzen und Antibiotika berichtet und von Du & Liu (2012) zusammengefasst. Die Anwesenheit des SDZ kann z.B. zu verändertem Wurzel-Geotropismus, Veränderungen der Wurzel Ausbildung und veränderter Wasseraufnahme der Pflanze führen, wie es zum Beispiel für *Zea mays* L. und *Salix fragilis* L. gezeigt wurde (Michelini *et al.*, 2012). Auch das muss bei einer abschließenden Bewertung der Effekte von Antibiotika auf die bakteriellen Gemeinschaften in der Rhizosphäre berücksichtigt werden.

4.3 Kurzzeiteffekte von SDZ-belasteter Gülle auf bakterielle Bodengemeinschaften

Ein primärer Effekt der Begüllung von landwirtschaftlich genutzten Flächen mit antibiotikabelasteter Gülle ist der Eintrag von resistenten Bakterien sowie der Eintrag von Antibiotikaresistenzgenen, die häufig mit mobilen genetischen Elementen assoziiert sind. Es gibt Studien, die nahelegen, dass die Güllebakterien nicht gut an den Boden adaptiert sind und es nach der Begüllung zu einer Abnahme der eingebrachten antibiotikaresistenten Bakterien kommt (Sengelov *et al.*, 2003, Hammesfahr *et al.*, 2008, Heuer *et al.*, 2008b). In dieser Arbeit konnte ebenfalls gezeigt werden, dass die Abundanz der eingebrachten *sul*-Gene mit der Zeit abnahm (Kopmann *et al.*, 2013), was vermutlich durch eine Abnahme der eingebrachten resistenten Bakterien begründet war. Gülle an sich ist jedoch auch als ein „hot spot“ für horizontalen Gentransfer und für ein hohes Vorkommen von mobilen genetischen Elementen wie z.B. Plasmiden, Transposons und ISCR-Elementen beschrieben (Binh *et al.*, 2008, Heuer *et al.*, 2011a). Diese Elemente, die häufig Resistenzgene tragen, können z.B. durch Konjugation und Mobilisierung effektiv in andere Bakterien und sogar über die Artgrenzen hinweg transferiert werden (Götz *et al.*, 1996, Götz & Smalla, 1997, Heuer *et al.*, 2011a, Heuer *et al.*, 2012b). Auch wenn es zur Abnahme der Güllebakterien kommt, können die auf transferablen Plasmiden lokalisierten Resistenzgene so an die bakterielle Bodengemeinschaft weitergegeben werden, besonders unter Selektionsdruck. Dies konnte durch die exogene Isolierung von SDZ-Resistenz vermittelnden Plasmiden gezeigt werden (Heuer & Smalla, 2007; Heuer *et al.*, 2009, 2012; Kopmann *et al.*, 2013). In dieser Arbeit wurde z.B. das Plasmid pHHV216 aus *E. coli* J53 in etliche Bodenbakterien transferiert, obwohl dieser Donor nicht an Bodenbedingungen adaptiert war. Für die Risikobewertung ist es also unerheblich, wie weit die bakteriellen Gemeinschaften in ihrer Zusammensetzung und Adaptionfähigkeit verschieden sind. Was wichtig ist, ist die Fähigkeit, die eingebrachten Gene zu transferieren. Der HGT über mobile genetische Elemente ermöglicht also den Austausch von Resistenzgenen zwischen verschiedenen bakteriellen Populationen. Zusätzlich wurde gezeigt, dass Begüllung zu einer erhöhten Kapazität der Bodenbakterien bezüglich der Aufnahme und Persistenz von Plasmiden führt (Musovic *et al.*, 2014). In dieser Doktorarbeit konnte mehrfach gezeigt werden, dass es nach Begüllung zu einer Zunahme der Abundanz und der Transferabilität von Resistenzgenen im Boden kommt (Jechalke *et al.*, 2013c, Kopmann *et al.*, 2013). Begüllung führt auch zu einem substantiellen Eintrag von Nährstoffen (z.B. Stickstoff und Kohlenhydraten) sowie zu einer Veränderung

des Mikroklimas (pH-Wert, Bodenfeuchte) im Boden (Poulsen *et al.*, 2013). Dies kann zu einer Verschiebung in der Zusammensetzung und somit Funktion der bakteriellen Gemeinschaft führen, auch wenn diese Veränderungen auf Phylum-Ebene nicht immer sichtbar sind (Poulsen *et al.*, 2013). Ding *et al.* (2014) konnten aufzeigen, dass sich durch wiederholte Begüllung die Zusammensetzung der bakteriellen Gemeinschaft im Boden auf Phylum-Ebene geringfügig ändert, man allerdings auf Gattungsebene sehr wohl Veränderungen der Zusammensetzung detektieren kann. Der Eintrag der Nährstoffe kann auch die Wirkung von Antibiotika verstärken, da z.B. bakteriostatische Antibiotika wie SDZ nur bei wachsenden Zellen wirken können (Brandt *et al.*, 2009).

Der Eintrag der Antibiotika führte auch zu einer Veränderung der Funktion und Struktur der bakteriellen Bodengemeinschaften. Schauss *et al.* (2009) konnten z.B. aufzeigen, dass Applikation von SDZ-belasteter Gülle auf Ackerboden zur Veränderung der Genabundanzen von nitrifizierenden und denitrifizierenden Bakterien im Boden führt und dort einen direkten Einfluss auf den Stickstoffkreislauf haben kann. Darüber hinaus liegen die in der Umwelt gemessenen Antibiotikakonzentrationen zwar im subtherapeutischen Bereich, aber dennoch wurde mehrfach gezeigt, dass sie auch in diesen niedrigen Konzentrationen selektiv wirken können (Gullberg *et al.*, 2011). Zusätzlich ist über die Funktion von Antibiotika in subinhibitorischen Konzentrationen als Genexpressionsregulationsmoleküle auf bakterielle Bodengemeinschaften wenig bekannt. (Gillings, 2013) legt den Schluss nahe, dass die Antibiotika ursprünglich als Kommunikationssystem der Bakterien entwickelt wurden. Dies wird durch Studien unterstützt, (Goh *et al.*, 2002, Linares *et al.*, 2006) die schätzen, dass 5 % aller bakteriellen genetischen Promotoren von Antibiotika affiziert werden. In einer vorhergehenden Arbeit wurde ein mathematisches Modell entwickelt, das zum Ziel hatte, den Verlauf der *sul*-Genabundanz in Relation mit den Kosten der *sul*-Gene, des HGT sowie der Selektion resistenter Bakterien in Anwesenheit des SDZ darzustellen. Das Modell zeigte einen selektiven Effekt auf *sul2*-Gene noch bei einer Konzentration von 15 mg/kg (Heuer *et al.*, 2008b). Zusätzlich, bedingt durch die Bodenstruktur, geht man davon aus, dass die Antibiotika nicht gleichmäßig verteilt im Boden vorkommen, sondern eher in „hot spots“.

Der Selektionsdruck der Antibiotika führt zu einer Verschiebung der bakteriellen Zusammensetzung, da sich resistente Taxa anreichern, während sensitive Taxa abnehmen - wie z.B. für SDZ gezeigt wurde (Ding *et al.*, 2014).

Andere Studien belegen, dass Antibiotika in subtherapeutischen Konzentrationen zur Kommunikation und Regulation innerhalb einer oder zwischen verschiedenen Bakterienpopulationen dienen (Aminov, 2009, Gillings, 2013). Auch dies kann innerhalb der bakteriellen Bodengemeinschaft zu kurzfristigen Effekten führen, die dieses komplexe regulatorische Netzwerk der Bodenbakterien stören, was wiederum Auswirkungen auf viele Prozesse des Ökosystems wie z.B. Nährstoffkreisläufe, Giftstoffabbau oder Förderung des Pflanzenwachstums haben kann (Ding & He, 2010).

In unseren Experimenten konnten kurzfristige Effekte von SDZ auf die Abundanz von *sul1*- und *sul2*-Resistenzgenen im Boden beobachtet werden. Zusätzlich wurde gezeigt, dass sich die TF dieser Gene mit selektivem Druck erhöhen und gleichzeitig sich das resistenzvermittelnde Plasmid pHHV216 anreichert (Jechalke *et al.*, 2013a, Jechalke *et al.*, 2013c, Kopmann *et al.*, 2013). Dies bestätigt das Ergebnis einer vorherigen Studie, in der die relativen Abundanzen der Resistenzgene *sul1* und *sul2* noch zwei Monate nach Zugabe von SDZ-Gülle signifikant erhöht waren (Heuer & Smalla, 2007). In Mikrokosmosstudien wurde zusätzlich eine Akkumulation der *sul1*- und *sul2*-Gene nach wiederholter Begüllung im nicht durchwurzelten Boden beobachtet (Heuer *et al.*, 2011a), was im Feldversuch zu dieser Arbeit nicht bestätigt werden konnte (Jechalke *et al.*, 2013c). Ein Grund könnte sein, dass im Gegensatz zu den Mikrokosmosstudien die Antibiotikakonzentrationen sowie die Nährstoffkonzentrationen der einzelnen Gülleapplikationen im Feldversuch teilweise erheblich voneinander differierten. Auch vermuten wir, dass Klimafaktoren wie z.B. Temperatur und Bodenfeuchte maßgeblich auf die Anreicherung und Verbreitung von Antibiotikaresistenzgenen einwirken können. Diese Zusammenhänge sind noch nicht ausreichend erfasst und müssen in Zukunft noch näher untersucht werden. Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass die SDZ-Behandlung den kultivierbaren Anteil SDZ-resistenter Bakterien sowie den konjugativen Transfer von SDZ-Resistenz vermittelnden Plasmiden auf *E. coli* signifikant erhöhte (Heuer & Smalla, 2007). In den Mesokosmos- und Feldexperimenten zu dieser Arbeit, bei denen im Gegensatz zu den Mikrokosmosversuchen praxisnahe Gülle von SDZ-behandelten Schweinen verwendet wurde, konnte ebenfalls eine relative Erhöhung der *sul1*- und *sul2*-Gene in Relation zu den 16S rRNA-Genen gemessen werden sowie eine erhöhte Transferabilität dieser Gene (Jechalke *et al.*, 2013c, Kopmann *et al.*, 2013).

4.4 Langzeiteffekte von SDZ-belasteter Gülle auf bakterielle Bodengemeinschaften

Seit der Entdeckung von Antibiotika für therapeutische Zwecke Mitte des 20. Jahrhunderts gibt es eine Belastung von landwirtschaftlich genutzten Flächen mit Antibiotika bzw. Resistenzdeterminanten. Allerdings sind damit assoziierte Langzeiteffekte auf bakterielle Bodengemeinschaften sowie die Abundanzen von Antibiotikaresistenzgenen wenig erforscht und somit schlecht verstanden. Es gibt eine Studie aus den Niederlanden, die das allgemeine Resistenzgenniveau in archivierten Böden untersucht hat und zu dem Ergebnis kam, dass die Abundanzen von Antibiotikaresistenzgenen, speziell denen, die Tetracyclinresistenz vermitteln, seit den 1980er Jahren gestiegen sind (Knapp *et al.*, 2010). Passend dazu hat eine Studie einen Anstieg von Tetracyclinresistenzgenen und Integrasegenen im Boden nach Applikation von Schweinegülle noch nach 16 Monaten aufzeigen können (Hong *et al.*, 2013).

In dieser Doktorarbeit erstreckte sich ein Feldversuch, bei dem Gülle von SDZ-behandelten Schweinen wiederholt auf Maisparzellen und Grasparzellen ausgebracht wurde, über eine komplette Vegetationsperiode von 180 Tagen (Jechalke *et al.*, 2013c). Dabei wurde, wie bereits erwähnt, über die Versuchsdauer keine dauerhafte Akkumulation bzw. Zunahme der SDZ-Resistenzgene gemessen. Im Gegenteil, im nicht durchwurzelter Boden der Grasparzellen sowie in der Rhizosphäre beider Versuchspflanzen lag zum Versuchsende die relative Abundanz der *sul*-Gene sogar im Bereich der Abundanz zu Versuchsbeginn. Das kann neben der schnelleren Dissipation des bioverfügbaren SDZ in der Rhizosphäre und wechselnden klimatischen Bedingungen mit dem dichten Wurzelnetz der gut gewachsenen Grassode zusammenhängen. Bei den Probenahmen war es nahezu unmöglich, Proben zu nehmen, in denen keine Wurzelreste gefunden wurden. Somit könnte der Rhizosphäreneffekt der schnelleren Dissipation des SDZ aus der CaCl_2 -Fraktion das Ergebnis des nicht durchwurzelter Bodens verfälscht haben. Außerdem wurde die Gülle nicht in den Boden eingearbeitet. Es kann aber auch ein Hinweis darauf sein, dass sich das Wachstumsstadium der Pflanze maßgeblich auf die Abundanz der Resistenzgene auswirkt. Die Grassode war zum Endpunkt des Experimentes schon längst ausgewachsen, und geringes Wurzelwachstum mit verminderter Wurzelexsudation könnte zu einer Veränderung der Zusammensetzung der bakteriellen Gemeinschaft und somit der Abundanz der *sul*-Gene geführt haben. Eine Studie von Marti *et al.* (2013) hat gezeigt, dass in feuchtem Kontinentalklima eine einjährige Erholung des Feldes nach Begüllung ausreichend war, um wieder die

initiale Hintergrundabundanz von bestimmten Antibiotikaresistenzgenen zu erreichen. Dies wurde in unserem Feldversuch für die Rhizosphäre bestätigt. Kürzlich wurde gezeigt, dass Gülle von Difloxacin (DIF)-behandelten Schweinen keinen klaren Effekt auf die Abundanz der DIF-Resistenzgene im Boden hatte, aber verglichen mit Gülle von unbehandelten Schweinen zu einem Anstieg der relativen Abundanzen von *sul1*-, *sul2*- und *int1*-Genen der Klasse 1-Integrons während der 140-tägigen Versuchsdauer führte (Jechalke *et al.*, 2013b), was die Wichtigkeit von Co-Selektion von Antibiotikaresistenzgenen in den Schweinen während der Antibiotikabehandlung hervorhebt.

Die Akkumulierung von Resistenzgenen auf mobilen genetischen Elementen mit anschließender Co-Selektion könnte wohl der gravierendste Langzeiteffekt der Ausbringung von Gülle mit Antibiotikabelastung sein. Es liegt in der Natur der Sache, dass sich mobile genetische Elemente in bakteriellen Populationen verbreiten, insbesondere wenn sie einen Selektionsvorteil für die sie tragenden Zellen darstellen wie z.B. bei Selektionsdruck durch Antibiotika, Metallverbindungen oder Detergentien. Dies kann dazu führen, dass diese Elemente über die Zeit weitere Antibiotikaresistenzgene aufnehmen bzw. akkumulieren. Kommt es zum selektiven Stress, so trägt das Plasmid mit entsprechender Resistenz einen Überlebensvorteil für die Bakterien und wird in der bakteriellen Gemeinschaft entsprechend dem Wirtsbereich angereichert. Gleichzeitig werden andere auf dem Plasmid liegende Resistenzen, die nicht akut benötigt werden, mit angereichert. Es gibt viele Beispiele von Plasmiden, die verschiedene Resistenzen für verschiedene Antibiotikaklassen tragen, z.B. das pHHV216 oder „Low GC-Plasmid“ (Heuer *et al.*, 2009), das fünf verschiedene Antibiotikaresistenzgene trägt. Plasmide, die zu dieser Gruppe gehören, wurden z.B. in 15 landesweit verteilten Gülletanks gefunden (Binh *et al.*, 2008).

In allen Experimenten, die innerhalb dieser Arbeit durchgeführt wurden, wurde das „Low GC-Plasmid“ in den Gülle sowie in den begüllten Böden nachgewiesen und diese Plasmidgruppe, die SDZ-Resistenz vermittelt, wurde am häufigsten in *E. coli* exogen aus begülltem Boden oder Gülle transferiert hat (Heuer *et al.*, 2009, Jechalke *et al.*, 2013c, Kopmann *et al.*, 2013). Darüber hinaus konnten Heuer *et al.* (2012b) aufzeigen, dass eine direkte quantitative Korrelation zwischen der Abundanz von IncP-1 ϵ Plasmiden und der Häufigkeit der Bodenbegüllung bestand.

Es ist bekannt, dass sich Resistenzgene, so sie denn erst einmal in einer bakteriellen Bodengemeinschaft etabliert sind, dort lange Zeit persistieren können, auch wenn

kein Selektionsdruck vorliegt (Johnsen *et al.*, 2009). Daher kann ihre Existenz innerhalb der Population langfristig sein, auch wenn die Entstehung bzw. Anreicherung dieser Gene durch selektiven Druck kurzfristig ist.

4.5 Relevanz der Ausbringung von antibiotikabelasteten Gülle für die Humanmedizin

Die Anreicherung von Antibiotikaresistenzgenen auf mobilen genetischen Elementen in der Umwelt erhöht die Wahrscheinlichkeit, dass es über HGT zu einem Austausch dieser Resistenzgene zwischen den Bodenbakterien und humanpathogenen Bakterien kommt. Das Resistom der Bakterien scheint genauso ubiquitär zu sein wie die Bakterien selbst, und die Kontaktstellen zwischen Bodenbakterium und humanpathogenen Bakterien sind vielfältig - z.B. auf dem Salatblatt, das wir essen. So wurden z.B. Antibiotikaresistenzgene von humanpathogenen Bakterien isoliert, die dieselbe Nukleotidsequenz haben wie Resistenzgene, die in verwandtschaftlich weit entfernten Bodenbakterien gefunden wurden (Forsberg *et al.*, 2012). In dieser Doktorarbeit wurden auch Hinweise auf eine direkte Brücke vom Bodenresistom zum Resistom von Humanpathogenen gefunden. So wurde in einer Mikrokosmosstudie gezeigt, dass das Plasmid pHHV216 im Boden erfolgreich zu *Acinetobacter baylyi* transferiert, hier persistiert und sich bei selektivem Stress durch die Anwesenheit des Antibiotikums SDZ innerhalb der Population anreichert (Jechalke *et al.*, 2013a). Ein Transfer zu humanpathogenen Vertretern dieser Gattung wie z.B. zu *Acinetobacter baumannii* - bekannt dafür, Entzündungen bei Verletzungen am Menschen auslösen zu können - scheint somit möglich.

Ein indirekter Weg zwischen den beiden Resistomen wurde von Heuer *et al.* (2009) nachgewiesen. Sie isolierten exogen ein SDZ-Resistenz vermittelndes IncP-1 ϵ Plasmid aus Feldeböden und brachten es in einem Mikrokosmosexperiment wieder in den Boden ein. Anschließend fischten sie das Plasmid über die vermittelten Antibiotikaresistenzen aus dem Boden und fanden es in einem bakteriellen Isolat mit hoher 16S rRNA-Gensequenzähnlichkeit zum potentiell infektionsauslösenden Bakterium *Enterobacter amnigenus* (Heuer *et al.*, 2012b).

Obwohl diese Effekte schwer zu quantifizieren sind, kamen Smith *et al.* (2005), basierend auf einem mathematischen Modell, zu dem Ergebnis, dass die in der Landwirtschaft vorkommenden Transmissionen von Resistenzgenen einen gravierenden Effekt auf die menschliche Gesundheit haben können - relativ zu der Krankenhaustransmission.

4.6 Fazit

Alle diese Studien haben eine diverse Bandbreite von kultivierungsabhängigen und unabhängigen Methoden genutzt, um die Effekte von Veterinärantibiotika, die mit der Gülle in den Boden gelangten, auf bakterielle Bodengemeinschaften zu bestimmen und zu quantifizieren. Die Mehrheit dieser Studien konnte zeigen, dass Antibiotika, die mit Gülle ausgebracht werden, zumindestens zu einem vorübergehenden Anstieg der Abundanz und Transferabilität der Resistenzgene führen.

Dass die Anwendung antibiotikabelasteter Gülle zu einer Verbreitung von Resistenzgenen innerhalb bakterieller Gemeinschaften durch mobile genetische Elemente im Boden führen kann, konnte in dieser Arbeit am Beispiel von SDZ gezeigt werden. Die beobachteten kurz- und längerfristigen Effekte dieser Antibiotika sind für eine abschließende Risikobewertung aber nur schwer zu quantifizieren. Dennoch ist offensichtlich, dass eine wiederholte, wenn auch vielleicht nur vorübergehende Anreicherung und Verbreitung von Resistenzgenen durch antibiotikabelastete Gülle zu neuen Resistenzphänotypen innerhalb der Bakterienpopulationen sowie zu einer Mobilisierung von Resistenzdeterminanten führen kann, wodurch langfristige Effekte auf die Struktur und Funktion von bakteriellen Bodengemeinschaften und auf das allgemeine Resistenzgenniveau entstehen können.

4.7 Abgleich der Zielstellung dieser Arbeit mit den Ergebnissen

I. Werden die Effekte von SDZ-belasteter Gülle auf die Abundanz und Transferabilität von SDZ-Resistenzgenen im Boden von der Rhizosphäre beeinflusst?

Der nicht durchwurzelte Boden sowie die Rhizosphäre besitzen die Fähigkeit, über die Zeit Antibiotikabelastungen abzubauen bzw. diese zu sequestrieren. Dieser Prozess scheint an der Wurzel durch erhöhte mikrobielle Aktivität und somit erhöhte Dissipationsraten schneller abzulaufen. Gleichzeitig scheinen die Effekte der Begüllung mit antibiotikabelasteten Gülle auf die Verbreitung von Resistenzgenen an der Wurzel durch HGT wesentlich stärker zu sein als im nicht durchwurzelten Boden. Im Gegensatz zum nicht durchwurzelten Boden konnten wir einen fortlaufenden selektiven Effekt auf die *sul*-Genabundanz in der Rhizosphäre bei sehr niedrigen SDZ-Konzentrationen messen. Die SDZ-Konzentrationen in der EAS-Fraktion nach Applikation SDZ-belasteter Gülle sanken schnell und erreichten innerhalb weniger Tage sehr geringe Werte, so dass die minimale Inhibitionsgränze

für SDZ unterschritten wird. Passend dazu konnten wir einen selektiven Effekt auf die Genabundanz im nicht durchwurzelten Boden nur kurz nach der Begüllung messen. In der Rhizosphäre waren die Dissipationsraten des SDZ noch größer, das heißt, die SDZ-Konzentration sank schneller in der EAS-Fraktion als im nichtdurchwurzeltem Boden. Allerdings wurde in der EAS-Fraktion der Rhizosphäre eine konstante geringe Menge des SDZ gemessen. Wir vermuten, dass dies eine konstante Entlassung von SDZ aus der RES in die EAS bedeutet, bedingt durch die Interaktion mit der Pflanze. Die Konzentrationen waren sehr gering ($< 5\mu\text{g/kg}$ Boden), dennoch konnten wir mehrfach eine konstante Selektion der *sul*-Gene an der Wurzel nachweisen. Dies passt zu den neueren Erkenntnissen, dass Resistenzgene durchaus schon bei subinhibitorischen Antibiotikakonzentrationen selektiert werden können.

Es hat sich bestätigt, dass sich die beiden Kompartimente dermaßen unterscheiden, dass man immer beide Kompartimente in Untersuchungen einbeziehen sollte, wenn man die Effekte des Antibiotikaeintrags in landwirtschaftlich genutzte Flächen untersuchen will.

II. Wie sind die Effekte des Pflanzenwachstums (Mais- und Grasrhizosphäre) auf die Abundanz und Transferabilität von Resistenzgenen in bakteriellen Bodengemeinschaften in Abhängigkeit vom Verbleib des SDZ und seiner Metabolite - sind diese Rhizosphäreneffekte pflanzenspezifisch? Wie werden diese Effekte durch wiederholte Gülleapplikationen im Feldversuch beeinflusst?

Die Ergebnisse dieser Doktorarbeit weisen auf pflanzenart- und pflanzenalterspezifische Reaktionen der bakteriellen Rhizosphäregemeinschaft auf die Behandlung des Bodens mit SDZ-kontaminierter Gülle hin. Die Ergebnisse des Feldversuchs zeigten Unterschiede bezüglich des Verbleibs des SDZ und seiner Metabolite zwischen Mais- und Grasrhizosphäre. Allerdings scheinen diese so gering zu sein, dass sie auf der Ebene der Abundanz und Transferabilität von Resistenzgenen in bakteriellen Rhizosphäregemeinschaften im Feldversuch nicht zu grundlegend verschiedenen Ergebnissen führen.

Pflanzenwachstumsabhängige Effekte auf der Ebene der Abundanz und Transferabilität von Resistenzgenen in bakteriellen Gemeinschaften konnten nicht verifiziert werden.

Im Gegensatz zu Mikro- und Mesokosmosstudien konnten wir keine Akkumulation der *sul*-Gene oder des SDZ im Boden bei wiederholter Begüllung messen. Im

Gegenteil, die *sul*-Abundanzen sanken sogar unter das initiale Niveau vor Güllezugabe. Auch die Transferfrequenzen dieser Gene waren offensichtlich durch die Begüllung an sich erhöht, aber eine konstante Erhöhung der Transferfrequenzen mit wiederholter Gülleapplikation wurde im Gegensatz zum Laborexperiment nicht gemessen. Das unterstreicht, wie wichtig Applikation, eingetragene Nährstoff- und Antibiotikakonzentrationen sowie Klimafaktoren für die Reaktion der bakteriellen Gemeinschaft auf Selektionsdruck bzw. Umweltstress sind.

III. Darstellung einer räumlichen Auflösung der Dynamik des SDZ und seiner Metabolite, Resistenzgene, Resistenzplasmide und ihrer Wirte in Abhängigkeit zum Abstand zur Rhizosphäre.

Innerhalb dieses Projektes wurden mehrere Experimente durchgeführt (Daten hier nicht gezeigt), um einen möglichen Rhizosphäregradienten bezüglich Resistenzgenabundanz, Resistenzplasmidabundanz und SDZ-Konzentration darzustellen. Erste Hinweise auf einen Rhizosphäregradienten in der Resistenzgenabundanz konnten nicht bestätigt werden.

Die unterschiedlichen Reaktionen bezüglich SDZ-Konzentration und Resistenzniveau der beiden Kompartimente (nicht durchwurzelter Boden und Rhizosphäre) wurden im Mesokosmos sowie im Feldversuch nachgewiesen, allerdings war die räumliche Auflösung dieser Experimente nicht geeignet, einen Gradienten aufzuzeigen.

Diese Arbeitshypothese kann abschließend nicht be- oder widerlegt werden, so dass ein neuer Ansatz mit verbesserten Experimenten geleistet werden muss.

IV. Um die Entwicklung von quantitativen Werkzeugen zur Plasmidökologie zu ermöglichen, sollen die Wirte der resistenzvermittelnden Plasmide im Boden und in der Gülle isoliert sowie taxonomisch identifiziert werden.

Wir konnten einige *Beta*- und *Gamma*-Proteobakterien identifizieren, die das pHHV216-Plasmid im Boden aufgenommen hatten. Dies wurde erwartet, da in einem vorhergehenden Experiment Transkonjuganten aus denselben Gruppen identifiziert worden waren. Den Transfer zu potentiell humanpathogenen Bodenbakterien konnten wir innerhalb dieser Arbeit beobachten, darüber hinaus gibt es einige bekannte humanpathogene Vertreter in den Klassen der *Beta*- und *Gamma*-Proteobakterien, was den Transfer des Plasmids zu anderen humanpathogenen Bakterien realistisch erscheinen lässt. Innerhalb dieses Projekts wurde ein Real Time

PCR-System entwickelt, das es erlaubt, die pHHV216-Plasmide in Gemeinschafts-DNA-Proben zu quantifizieren.

Weitere Untersuchungen sind erforderlich, um herauszufinden, wie breit das Wirtsspektrum des Plasmids ist und ob das entwickelte PCR-System die Gruppe der „Low GC-Plasmide“ oder der pHHV216-Plasmidgruppe abdeckt.

V. Überleben die aus der Gülle kommenden Wirte im Boden, wird das Überleben von aus der Gülle stammenden Populationen durch die Pflanze unterstützt?

In dieser Arbeit gab es nur einen Hinweis darauf, dass Fäkal- bzw. Güllebakterien im Boden und in der Rhizosphäre überleben können. Bei der Suche nach möglichen nativen Wirten des pHHV216-Plasmids im Boden und in der Rhizosphäre erhielten wir drei Isolate, die wahrscheinlich unser auxotropher *E. coli* Donorstamm waren, und wir hatten drei *E. coli* Isolate, die definitiv nicht der Donorstamm waren. *E. coli* ist ein typisches Fäkalbakterium und nicht dafür bekannt, aus dem Boden und/oder der Rhizosphäre isoliert zu werden. Das heißt, es muss einen Faktor gegeben haben, der dieses Ergebnis verursacht hat. Allerdings ließ das experimentelle Design keine genauere Eingrenzung dieses Faktors zu. Denkbar wäre, dass die Rhizosphäre mit ihren Wurzelexsudaten das Überleben der an Güllebedingungen adaptierten Bakterienstämme ermöglicht hat. Dagegen spricht allerdings, dass zwei der sechs *E. coli* Isolate aus Proben von nicht durchwurzeltem Boden stammen. Dieses Ergebnis deutet eher darauf hin, dass sich durch die initiale Begüllung ein Mikroklima oder ein Nährstoffniveau eingestellt hat, das das Überleben dieser Fäkalbakterien über vier Wochen ermöglichte. Die genetische Struktur des pHHV216-Plasmids gibt keinerlei Hinweise auf mögliche Fitnessvorteile für Fäkalbakterien, die ihnen das Überleben im Boden oder an der Wurzel erleichtern.

Weitere Experimente bezüglich des Mikroklimas in der Rhizosphäre sowie des Einflusses der initialen Begüllung müssten durchgeführt werden, um den Einfluss der Pflanze auf das Überleben von aus Gülle stammenden Bakterien genauer eingrenzen und somit verifizieren zu können.

VI. Wie beeinflussen die resistenzvermittelnden Plasmide die Fitness ihrer Wirte im Boden, im begüllten Boden und in der Rhizosphäre?

In allen durchgeführten exogenen Plasmidisolierungen dieser Veröffentlichungen war die Gruppe der „Low GC-Plasmide“ der am häufigsten gefischte Plasmidtyp, der

SDZ-Resistenz vermittelt. Das weist darauf hin, dass die kürzlich entdeckte Gruppe der „Low GC-Plasmide“ einen wichtigen Beitrag zur SDZ-Resistenz in Gülle und begülltem Boden leistet. Darüber hinaus konnten wir in den Kapiteln 3.3 und 3.4 zeigen, dass sich das Plasmid pHHV216 in einer *Acinetobacter baylyi*-Population im Boden unter Selektionsdruck durch SDZ anreichert, das heißt, es bietet *Acinetobacter baylyi* bei bestehendem SDZ-Selektionsdruck einen Fitnessvorteil im nicht durchwurzelter Boden und in der Rhizosphäre. Bei nicht vorhandenem Selektionsdruck konnten wir hingegen eine Abnahme der plasmidhaltigen Population im Boden und in der Rhizosphäre beobachten, was auf einen Fitnessnachteil hinweist.

Da wir einerseits die Mechanismen, die zur Evolution und Verbreitung von Resistenzgenen in bakteriellen Gemeinschaften beitragen, noch nicht vollkommen verstanden und andererseits ein schnell wachsendes Problem mit einer zunehmenden Anzahl von multiresistenten humanpathogenen Bakterien haben, ist es dringend geboten, unseren Einfluss auf diese Entwicklung zu verstehen und mögliche von uns verursachte Risiken zu minimieren. Eine Ursache zur Entstehung multiresistenter Bakterien stellt die hohe durch den Menschen verursachte Antibiotika-Emission in die Umwelt, z.B. in Ackerböden oder Abwässer, dar. Darüber hinaus gibt es aber auch künstliche „hot spots“ des Transfers oder Schwerpunkte wie z.B. Wasseraufbereitungsanlagen oder Tierzuchten. Das sind die Punkte, an denen wir die Verbreitung und Anreicherung von Antibiotikaresistenzgenen im ubiquitären Resistom am ehesten reduzieren können. In dieser Studie konnten wir einen Beitrag zum Verständnis der Anreicherung und Verbreitung von Antibiotikaresistenzgenen in Ackerböden beitragen.

Abschließend seien hier noch einige Ansätze genannt, die das Problem der Belastung der Umwelt durch Einbringung von Antibiotika und Antibiotikaresistenzdeterminanten durch Gülle reduzieren könnten:

- Der bewusster und somit geringere Einsatz von Antibiotika in der Human- sowie Veterinärmedizin ist dringend geboten. Dazu wurden in den letzten Jahren schon etliche und wichtige Schritte vom Gesetzgeber vorgenommen, z.B. das EU-weite Verbot der Antibiotika als Wachstumsförderer in der Tierhaltung, die exakte Dokumentation von Veterinärmedizinern über den Gebrauch von Antibiotika u.v.m. Allerdings ist dieser Weg lediglich dazu geeignet, Belastungen zu minimieren, aber nicht, sie zu unterbinden. An

diesem Punkt wäre es auch sinnvoll, das Einkommen der Veterinärmediziner von den verschriebenen Antibiotikamengen zu entkoppeln, wie in Dänemark geschehen.

- Die Reduzierung des Einsatzes von Desinfektionsmitteln und Schwermetallen, die über Co-Selektion zu einer Anreicherung von Antibiotikaresistenzen führen können.
- Entfernung der Antibiotika und Resistenzdeterminanten aus Human- und Tierfäkalien. Mögliche Umsetzungswege wären z.B. chemische Separation, Hitzeneutralisierung, Membranfiltertechnologie, UV- oder Ozon-Behandlung von belasteten Abwässern oder Kompostierung der Fäkalien vor der Ausbringung in die Umwelt. Dies wäre wohl der sicherste, allerdings auch der kostenintensivste Weg, das Problem zu bekämpfen.
- Weiterführende Erforschung aller an der Entstehung und Verbreitung von Antibiotikaresistenzgenen beteiligten Faktoren, um exakte Schwellenwerte für die Emission von Antibiotika in die Umwelt erstellen zu können, die keine signifikanten Effekte in den verschiedenen Ökosystemen hervorrufen können.
- Evaluierung möglicher Übertragungswege von Antibiotikaresistenzgenen vom Bodenresistom zum menschlichen Resistom, wie z.B. über pflanzliche Nahrungsmittel, Wasser, Luft und Tiere.

5 Tätigkeitsangaben zu den Veröffentlichungen

Titel: Abundance and transferability of antibiotic resistance as related to the fate of sulfadiazine in maize rhizosphere and bulk soil

Magazin: FEMS Microbiology Ecology 83 (2013) 125-134

Autorenliste: Christoph Kopmann, Sven Jechalke, Ingrid Rosendahl, Joost Groeneweg, Ellen Krögerrecklenfort, Ute Zimmerling, Viola Weichelt, Jan Siemens, Wulf Amelung, Holger Heuer, Kornelia Smalla.

Tätigkeitsangabe: Christoph Kopmann hat fast alle Probenahmen sowie die anschließende Extraktion aller Gemeinschafts-DNAs durchgeführt. Des weiteren hat Christoph Kopmann die Quantifizierung der SDZ-Resistenzgene per Real-Time-PCR und deren graphische Darstellung erstellt. Die Experimente zur exogenen Plasmidisolierung wurden größtenteils ebenfalls von ihm durchgeführt, während die Analyse und graphische Darstellung dieser Daten ausschließlich von ihm erstellt wurden. Bei der Verfassung dieser Veröffentlichung war er maßgeblich an der Erstellung der Einleitung, des Material und Methoden-Teils sowie an der Darstellung und Beschreibung der Ergebnisse beteiligt.

Titel: Increased Abundance and Transferability of Resistance Genes after Field Application of Manure from Sulfadiazine-Treated Pigs**Magazin:** Applied and Environmental Microbiology 79 (2013)**Autorenliste:** Christoph Kopmann, Sven Jechalke, Ingrid Rosendahl, Joost Groeneweg, Viola Weichelt, Ellen Krögerrecklenfort, Nikola Brandes, Mathias Nordwig, Guo-Chun Ding, Jan Siemens, Holger Heuer, Kornelia Smalla.**Tätigkeitsangabe:** Christoph Kopmann war bei dem überwiegenden Teil der Probenahmen dabei und hat die anschließende Extraktion aller Gemeinschafts-DNAs durchgeführt. Darüber hinaus hat er die Quantifizierung der SDZ-Resistenzgene per Real-Time-PCR und deren graphische Darstellung in Korrelation mit den SDZ-Konzentrationen erstellt. Die statistische Auswertung erfolgte in Zusammenarbeit mit Holger Heuer und Sven Jechalke. Die Experimente zur exogenen Plasmidisolierung wurden ebenfalls zu einem großen Teil von ihm durchgeführt, während die Analyse und die graphische Darstellung dieser Daten ausschließlich von ihm erarbeitet wurden. Bei der Verfassung dieser Veröffentlichung war er maßgeblich an der Einleitung, am Material und Methoden-Teil sowie an der Darstellung und Beschreibung der Ergebnisse beteiligt.

Titel: Plasmid-mediated fitness advantage of *Acinetobacter baylyi* in sulfadiazine-polluted soils

Magazin: Applied and Environmental Microbiology 79 (2013)

Autorenliste: Sven Jechalke, Christoph Kopmann, Mona Richter, Sylvia Moenickes, Holger Heuer, Kornelia Smalla.

Tätigkeitsangabe: Bei der Konzeption dieses Experimentes war Christoph Kopmann beteiligt, die Experimente wurden von ihm etabliert sowie ausgeführt. Alle Probenahmen sowie die anschließenden Plattierungen und die Darstellung der daraus resultierenden Daten hat Christoph Kopmann erstellt. Das Skript dieser Veröffentlichung hat er zusammen mit Sven Jechalke verfasst.

Titel: Wirtsbereichsbestimmung des Plasmids pHHV216 und Charakterisierung des Einflusses der Rhizosphäre auf den Fitnessvorteil plasmidtragender *Acinetobacter baylyi* Populationen in Sulfadiazin-belastetem Boden

Nicht veröffentlicht

Tätigkeitsangabe: Bei der Konzeption dieses Experimentes war Christoph Kopmann beteiligt, er hat die Experimente etabliert und ausgeführt. Er hat auch alle Probenahmen sowie die anschließenden Plattierungen und die Darstellung der daraus resultierenden Daten durchgeführt. Das Skript dieser Veröffentlichung ist von ihm verfasst worden.

6 Literatur

- Abraham EP, Chain E, Fletcher CM, Gardner AD, Heatley NG, Jennings MA & Florey HW (1941) Further observations on Penicillin. *Lancet* **241**: 177-188.
- Achari A, Somers DO, Champness JN, Bryant PK, Rosemond J & Stammers DK (1997) Crystal structure of the anti-bacterial sulfonamide drug target dihydropteroate synthase. *Nature Structural Biology* **4**: 490-497.
- Amabilecuevas CF & Chicurel ME (1992) Bacterial plasmids and gene flux. *Cell* **70**: 189-199.
- Aminov RI (2009) The role of antibiotics and antibiotic resistance in nature. *Environmental Microbiology* **11**: 2970-2988.
- Anonymus (2007) Verordnung über die Anwendung von Düngemitteln, Bodenhilfsstoffen, Kultursubstraten und Pflanzenhilfsmitteln nach den Grundsätzen der guten fachlichen Praxis beim Düngen (Düngeverordnung - DüV). http://www.gesetze-im-internet.de/bundesrecht/d_v/gesamt.pdf (accessed 12/12/2012).
- Antunes P, Machado J & Peixe L (2006) Characterization of antimicrobial resistance and class 1 and 2 integrons in *Salmonella enterica* isolates from different sources in Portugal. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **58**: 297-304.
- Ashelford KE, Day MJ & Fry JC (2003) Elevated abundance of bacteriophage infecting bacteria in soil. *Applied and Environmental Microbiology* **69**: 285-289.
- Aust MO, Thiele-Bruhn S, Seeger J, Godlinski F, Meissner R & Leinweber P (2010) Sulfonamides leach from sandy loam soils under common agricultural practice. *Water Air and Soil Pollution* **211**: 143-156.
- Baker-Austin C, Wright MS, Stepanauskas R & McArthur JV (2006) Co-selection of antibiotic and metal resistance. *Trends in Microbiology* **14**: 176-182.
- Bale MJ, Day MJ & Fry JC (1988) Novel Method for studying Plasmid Transfer in undisturbed River Epilithon. *Applied and Environmental Microbiology* **54**: 2756-2758.
- Ball P (2000) Quinolone generations: natural history or natural selection? *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **46**: 17-24.
- Baltz RH (2006) Molecular engineering approaches to peptide, polyketide and other antibiotics. *Nature Biotechnology* **24**: 1533-1540.
- Beck EG (2001) Genetik von Bakterien und Viren. *Zentrale für Unterrichtsmedien (ZUM) Internet e.V.* <http://www.zum.de/Faecher/Materialien/beck/13/bs13-17.htm>.
- Berg G & Smalla K (2009) Plant species and soil type cooperatively shape the structure and function of microbial communities in the rhizosphere. *FEMS Microbiol Ecol* **68**: 1-13.
- Bergstrom CT, Lipsitch M & Levin BR (2000) Natural selection, infectious transfer and the existence conditions for bacterial plasmids. *Genetics* **155**: 1505-1519.
- Berka RM, Hahn J, Albano M, *et al.* (2002) Microarray analysis of the *Bacillus subtilis* K-state: genome-wide expression changes dependent on ComK. *Molecular Microbiology* **43**: 1331-1345.
- Bialk HM, Hedman C, Castillo A & Pedersen JA (2007) Laccase-mediated michael addition of N-15-sulfapyridine to a model humic constituent. *Environmental Science & Technology* **41**: 3593-3600.
- Binh CTT, Heuer H, Kaupenjohann M & Smalla K (2008) Piggery manure used for soil fertilization is a reservoir for transferable antibiotic resistance plasmids. *Fems Microbiology Ecology* **66**: 25-37.
- Binh CTT, Heuer H, Gomes NCM, Kaupenjohann M & Smalla K (2010) Similar bacterial community structure and high abundance of sulfonamide resistance genes in field-scale manures. In: *Manure Management, Uses and Environmental Impact*, Dellaguardia, CS., pp. 141-166, Nova Science Publishers, Hauppauge, NY, USA.

- Binh CTT, Heuer H, Gomes NCM, *et al.* (2007) Short-term effects of amoxicillin on bacterial communities in manured soil. *Fems Microbiology Ecology* **62**: 290-302.
- Bock L, Miller GH, Schaper KJ & Seydel JK (1974) Sulfonamide structure-activity-relationships in a cell-free system. 2. Proof for formation of a sulfonamide-containing folate analog. *Journal of Medicinal Chemistry* **17**: 23-28.
- Bottcher HM (1964) A History of Antibiotics. *JB Lippincott Company, Philadelphia*.
- Boxall AB, Fogg LA, Blackwell PA, Kay P, Pemberton EJ & Croxford A (2004) Veterinary medicines in the environment. *Rev Environ Contam Toxicol* **180**: 1-91.
- Boxall ABA, Johnson P, Smith EJ, Sinclair CJ, Stutt E & Levy LS (2006) Uptake of veterinary medicines from soils into plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **54**: 2288-2297.
- Brandt KK, Sjøholm OR, Krogh KA, Halling-Sørensen B & Nybroe O (2009) Increased pollution-induced bacterial community tolerance to sulfadiazine in soil hotspots amended with artificial root exudates. *Environ. Sci. Technol.* **43**: 2963-2968.
- Braschi I, Blasioli S, Fellet C, Lorenzini R, Garelli A, Pori M & Giacomini D (2013) Persistence and degradation of new beta-lactam antibiotics in the soil and water environment. *Chemosphere* **93**: 152-159.
- Burkhardt M, Stamm C, Waul C, Singer H & Müller S (2005) Surface runoff and transport of sulfonamide antibiotics and tracers on manured grassland. *Journal of Environmental Quality* **34**: 1363-1371.
- BVL (2013) Zweite Datenerhebung zur Antibiotikaabgabe in der Tiermedizin. Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit, Berlin.
- Cabello FC, Godfrey HP, Tomova A, Ivanova L, Dolz H, Millanao A & Buschmann AH (2013) Antimicrobial use in aquaculture re-examined: its relevance to antimicrobial resistance and to animal and human health. *Environmental Microbiology* **15**: 1917-1942.
- Chee-Sanford JC, Aminov RI, Krapac IJ, Garrigues-Jeanjean N & Mackie RI (2001) Occurrence and diversity of tetracycline resistance genes in lagoons and groundwater underlying two swine production facilities. *Applied and Environmental Microbiology* **67**: 1494-1502.
- Coates ARM, Halls G & Hu YM (2011) Novel classes of antibiotics or more of the same? *British Journal of Pharmacology* **163**: 184-194.
- D'Costa VM, McGrann KM, Hughes DW & Wright GD (2006) Sampling the antibiotic resistome. *Science* **311**: 374-377.
- Dalkmann P, Willaschek E, Schiedung H, Bornemann L, Siebe C & Siemens J (2014) Long-term wastewater irrigation reduces sulfamethoxazole sorption, but not ciprofloxacin binding in Mexican soils. *J. Environm. Qual.* doi: 10.2134/jeq2013.2111.0473.
- Dalkmann P, Broszat M, Siebe C, *et al.* (2012) Accumulation of pharmaceuticals, *Enterococcus*, and resistance genes in soils irrigated with wastewater for zero to 100 years in central Mexico. *PLoS ONE* **7**: e45397.
- Davies J & Davies D (2010) Origins and Evolution of Antibiotic Resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **74**: 417-433.
- Davies J, Spiegelman GB & Yim G (2006) The world of subinhibitory antibiotic concentrations. *Current Opinion in Microbiology* **9**: 445-453.
- Davison J (1999) Genetic exchange between bacteria in the environment. *Plasmid* **42**: 73-91.
- Ding C & He JZ (2010) Effect of antibiotics in the environment on microbial populations. *Applied Microbiology and Biotechnology* **87**: 925-941.
- Ding GC, Radl V, Hai B, Jechalke S, Heuer H, Smalla K & Schlöter M (2014) Dynamics of soil bacterial communities in response to repeated application of manure containing sulfadiazine. *PLoS ONE* **9**: e92958.

- Doornbos RF, van Loon LC & Bakker P (2012) Impact of root exudates and plant defense signaling on bacterial communities in the rhizosphere. A review. *Agronomy for Sustainable Development* **32**: 227-243.
- Du LF & Liu WK (2012) Occurrence, fate, and ecotoxicity of antibiotics in agro-ecosystems. A review. *Agronomy for Sustainable Development* **32**: 309-327.
- Duggar BM (1948) Aureomycin a product of the continuing search for new antibiotics. *Annals of the New York Academy of Sciences* **51**: 177-&.
- Eggen T, Asp TN, Grave K & Hormazabal V (2011) Uptake and translocation of metformin, ciprofloxacin and narasin in forage- and crop plants. *Chemosphere* **85**: 26-33.
- EFSA (2006) *Europäisches Informationszentrum für Lebensmittelsicherheit*.
- Figuerola-Diva RA, Vasudevan D & MacKay AA (2010) Trends in soil sorption coefficients within common antimicrobial families. *Chemosphere* **79**: 786-793.
- Fleming A (1929) On the antibacterial action of cultures of a *penicillium*, with special reference to their use in isolation of *B. influenza*. *British Journal Exp. Pathol* **10**: 226-236.
- Forsberg KJ, Reyes A, Wang B, Selleck EM, Sommer MOA & Dantas G (2012) The shared antibiotic resistome of soil bacteria and human pathogens. *Science* **337**: 1107-1111.
- Förster M, Laabs V, Lamshöft M, *et al.* (2009) Sequestration of manure-applied sulfadiazine residues in soils. *Environ. Sci. Technol.* **43**: 1824-1830.
- Füssler C (2011) Wenn die Gülle sauer wird. *Zeit Online* <http://www.zeit.de/2011/2024/Weg-der-Guelle/komplettansicht>.
- Gebhard F & Smalla K (1998) Transformation of *Acinetobacter* sp. strain BD413 by transgenic sugar beet DNA. *Applied and Environmental Microbiology* **64**: 1550-1554.
- Gillings MR (2013) Evolutionary consequences of antibiotic use for the resistome, mobilome, and microbial pangenome. *Frontiers in Microbiology* **4**: 10.
- Gillings MR (2014) Integrons: past, present, and future. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **78**: 257-277.
- Goh EB, Yim G, Tsui W, McClure J, Surette MG & Davies J (2002) Transcriptional modulation of bacterial gene expression by subinhibitory concentrations of antibiotics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**: 17025-17030.
- Gohl O, Friedrich A, Hoppert M & Averhoff B (2006) The thin pili of *Acinetobacter* sp. strain BD413 mediate adhesion to biotic and abiotic surfaces. *Applied and Environmental Microbiology* **72**: 1394-1401.
- Götz A & Smalla K (1997) Manure enhances plasmid mobilization and survival of *Pseudomonas putida* introduced into field soil. *Applied and Environmental Microbiology* **63**: 1980-1986.
- Götz A, Pukall R, Smit E, *et al.* (1996) Detection and characterization of broad-host-range plasmids in environmental bacteria by PCR. *Applied and Environmental Microbiology* **62**: 2621-2628.
- Griffin MO, Fricovsky E, Ceballos G & Villarreal F (2010) Tetracyclines: a pleiotropic family of compounds with promising therapeutic properties. Review of the literature. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* **299**: C539-C548.
- Guan X, Xue X, Liu Y, *et al.* (2013) Plasmid-mediated quinolone resistance - current knowledge and future perspectives. *Journal of International Medical Research* **41**: 20-30.
- Gulkowska A, Sander M, Hollender J & Krauss M (2013) Covalent binding of sulfamethazine to natural and synthetic humic acids: assessing laccase catalysis and covalent bond stability. *Environmental Science & Technology* **47**: 6916-6924.

- Gullberg E, Cao S, Berg OG, Ilbäck C, Sandegren L, Hughes D & Andersson DI (2011) Selection of resistant bacteria at very low antibiotic concentrations. *PLoS Pathog.* **7**: e1002158.
- Gustafson RH (1985) Antibiotics use in agriculture: an overview. *Abstracts of Papers American Chemical Society* **190**.
- Hacker J, Hochhut B, Middelndorf B, Schneider G, Buchrieser C, Gottschalk G & Dobrindt U (2004) Pathogenomics of mobile genetic elements of toxigenic bacteria. *International Journal of Medical Microbiology* **293**: 453-461.
- Hall BG & Barlow M (2004) Evolution of the serine beta-lactamases: past, present and future. *Drug Resistance Updates* **7**: 111-123.
- Hammesfahr U, Heuer H, Manzke B, Smalla K & Thiele-Bruhn S (2008) Impact of the antibiotic sulfadiazine and pig manure on the microbial community structure in agricultural soils. *Soil Biology & Biochemistry* **40**: 1583-1591.
- Hamscher G, Pawelzick HT, Hoper H & Nau H (2005) Different behavior of tetracyclines and sulfonamides in sandy soils after repeated fertilization with liquid manure. *Environmental Toxicology and Chemistry* **24**: 861-868.
- Hermann T (2007) Aminoglycoside antibiotics: old drugs and new therapeutic approaches. *Cellular and Molecular Life Sciences* **64**: 1841-1852.
- Heuer H & Smalla K (2007) Manure and sulfadiazine synergistically increased bacterial antibiotic resistance in soil over at least two months. *Environmental Microbiology* **9**: 657-666.
- Heuer H & Smalla K (2012) Plasmids foster diversification and adaptation of bacterial populations in soil. *FEMS Microbiol Rev* **36**: 1083-1104.
- Heuer H, Fox RE & Top EM (2007) Frequent conjugative transfer accelerates adaptation of a broad-host-range plasmid to an unfavorable *Pseudomonas putida* host. *Fems Microbiology Ecology* **59**: 738-748.
- Heuer H, Abdo Z & Smalla K (2008a) Patchy distribution of flexible genetic elements in bacterial populations mediates robustness to environmental uncertainty. *Fems Microbiology Ecology* **65**: 361-371.
- Heuer H, Schmitt H & Smalla K (2011a) Antibiotic resistance gene spread due to manure application on agricultural fields. *Curr. Opin. Microbiol.* **14**: 236-243.
- Heuer H, Kopmann C, Binh CTT, Top EM & Smalla K (2009) Spreading antibiotic resistance through spread manure: characteristics of a novel plasmid type with low %G plus C content. *Environmental Microbiology* **11**: 937-949.
- Heuer H, Focks A, Lamshöft M, Smalla K, Matthies M & Spiteller M (2008b) Fate of sulfadiazine administered to pigs and its quantitative effect on the dynamics of bacterial resistance genes in manure and manured soil. *Soil Biology & Biochemistry* **40**: 1892-1900.
- Heuer H, Kopmann C, Zimmerling U, *et al.* (2012a) Effect of veterinary medicines introduced via manure into soil on the abundance and diversity of antibiotic resistance genes and their transferability. *Antimicrobial resistance in the environment*, Keen, P. L., Montforts, M.H.M.M., pp. 453-463, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey.
- Heuer H, Solehati Q, Zimmerling U, *et al.* (2011b) Accumulation of sulfonamide resistance genes in arable soils due to repeated application of manure containing sulfadiazine. *Applied and Environmental Microbiology* **77**: 2527-2530.
- Heuer H, Binh CTT, Jechalke S, *et al.* (2012b) IncP-1 ϵ plasmids are important vectors of antibiotic resistance genes in agricultural systems: diversification driven by class 1 integron gene cassettes. *Front. Microbiol.* **3**: doi: 10.3389/fmicb.2012.00002.
- Heuer H, Krögerrecklenfort E, Wellington EMH, *et al.* (2002) Gentamicin resistance genes in environmental bacteria: prevalence and transfer. *Fems Microbiology Ecology* **42**: 289-302.

- Hill KE & Top ME (1998) Gene transfer in soil systems using microcosms. *FEMS Microbiology Ecology* **25**: 319-329.
- Hill KE, Weightman AJ & Fry JC (1992) Isolation and screening of plasmids from the epilithon which mobilize recombinant plasmid PD10. *Applied and Environmental Microbiology* **58**: 1292-1300.
- Hong PY, Yannarell AC, Dai QH, Ekizoglu M & Mackie RI (2013) Monitoring the perturbation of soil and groundwater microbial communities due to pig production activities. *Applied and Environmental Microbiology* **79**: 2620-2629.
- Hsu TS & Bartha R (1979) Accelerated mineralization of two organophosphate insecticides in the rhizosphere. *Applied and Environmental Microbiology* **37**: 36-41.
- Hu XG, Zhou QX & Luo Y (2010) Occurrence and source analysis of typical veterinary antibiotics in manure, soil, vegetables and groundwater from organic vegetable bases, northern China. *Environmental Pollution* **158**: 2992-2998.
- Humphrey B, Thomson NR, Thomas CM, *et al.* (2012) Fitness of *Escherichia coli* strains carrying expressed and partially silent IncN and IncP1 plasmids. *Bmc Microbiology* **12**: doi: 10.1186/1471-2180-1112-1153.
- Jechalke S, Heuer H, Siemens J, Amelung W & Smalla K (2014) Fate and effects of veterinary antibiotics in soil. *Trends in Microbiology* **22**: 536-545.
- Jechalke S, Kopmann C, Richter M, Moenickes S, Heuer H & Smalla K (2013a) Plasmid-mediated fitness advantage of *Acinetobacter baylyi* in sulfadiazine-polluted soil. *FEMS Microbiology Letters* **348**: 127-132.
- Jechalke S, Focks A, Rosendahl I, Groeneweg J, Siemens J, Heuer H & Smalla K (2013b) Structural and functional response of the soil bacterial community to application of manure from difloxacin-treated pigs. *FEMS Microbiology Ecology* doi: 10.1111/1574-6941.12191.
- Jechalke S, Kopmann C, Rosendahl I, *et al.* (2013c) Increased abundance and transferability of resistance genes after field application of manure from sulfadiazine-treated pigs. *Applied and Environmental Microbiology* **79**: 1704-1711.
- Jenke-Kodama H & Dittmann E (2009) Evolution of metabolic diversity: Insights from microbial polyketide synthases. *Phytochemistry* **70**: 1858-1866.
- Johnsen PJ, Townsend JP, Bøhn T, Simonsen GS, Sundsfjord A & Nielsen KM (2009) Factors affecting the reversal of antimicrobial-drug resistance. *The Lancet Infectious Diseases* **9**: 357-364.
- Junge T, Classen N, Schäffer A & Schmidt B (2012) Fate of the veterinary antibiotic C-14-difloxacin in soil including simultaneous amendment of pig manure with the focus on non-extractable residues. *Journal of Environmental Science and Health Part B-Pesticides Food Contaminants and Agricultural Wastes* **47**: 858-868.
- Junge T, Meyer KC, Ciecieski K, Adams A, Schäffer A & Schmidt B (2011) Characterization of non-extractable (14)C- and (13)C-sulfadiazine residues in soil including simultaneous amendment of pig manure. *Journal of Environmental Science and Health Part B-Pesticides Food Contaminants and Agricultural Wastes* **46**: 137-149.
- Juni E & Janik A (1969) Transformation of *Acinetobacter calco-aceticus* (*Bacterium anitratum*). *Journal of bacteriology* **98**: 281-288.
- Kang DH, Gupta S, Rosen C, *et al.* (2013) Antibiotic uptake by vegetable crops from manure-applied soils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **61**: 9992-10001.
- Kemper N (2008) Veterinary antibiotics in the aquatic and terrestrial environment. *Ecol. Indic.* **8**: 1-13.
- Kieser T, Bibb M, Buttner M, Chater K & Hopwood D (2000) Practical Streptomyces Genetics. *The John Innes Foundation, Norwich*.

- Knapp CW, Dolfing J, Ehlert PAI & Graham DW (2010) Evidence of increasing antibiotic resistance gene abundances in archived soils since 1940. *Environmental Science & Technology* **44**: 580-587.
- Kong KF, Schneper L & Mathee K (2010) Beta-lactam antibiotics: from antibiosis to resistance and bacteriology. *APMIS* **118**: 1-36.
- Kopmann C, Jechalke S, Rosendahl I, *et al.* (2013) Abundance and transferability of antibiotic resistance as related to the fate of sulfadiazine in maize rhizosphere and bulk soil. *Fems Microbiology Ecology* **83**: 125-134.
- Kreuzig R & Hölting S (2005) Investigations on the fate of sulfadiazine in manured soil: laboratory experiments and test plot studies. *Environmental Toxicology and Chemistry* **24**: 771-776.
- Kroer N, Barkay T, Sorensen S & Weber D (1998) Effect of root exudates and bacterial metabolic activity on conjugal gene transfer in the rhizosphere of a marsh plant. *FEMS Microbiology Ecology* **25**: 375-384.
- Kropf S, Heuer H, Grüning M & Smalla K (2004) Significance test for comparing complex microbial community fingerprints using pairwise similarity measures. *Journal of Microbiological Methods* **57**: 187-195.
- Kümmerer K (2003) Significance of antibiotics in the environment. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **52**: 5-7.
- Kuzyakov Y & Domanski G (2000) Carbon input by plants into the soil. Review. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science-Zeitschrift Für Pflanzenernährung und Bodenkunde* **163**: 421-431.
- Lamshöft M, Sukul P, Zühlke S & Spiteller M (2007) Metabolism of C-14-labelled and non-labelled sulfadiazine after administration to pigs. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **388**: 1733-1745.
- Lamshöft M, Sukul P, Zühlke S & Spiteller M (2010) Behaviour of C-14-sulfadiazine and C-14-difloxacin during manure storage. *Science of the Total Environment* **408**: 1563-1568.
- Lenski RE, Rose MR, Simpson SC & Tadler SC (1991) Long-term experimental evolution in *Escherichia coli*. 1. Adaptation and divergence during 2,000 generations. *American Naturalist* **138**: 1315-1341.
- Li YW, Wu XL, Mo CH, Tai YP, Huang XP & Xiang L (2011) Investigation of sulfonamide, tetracycline, and quinolone antibiotics in vegetable farmland soil in the Pearl River Delta area, southern China. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **59**: 7268-7276.
- Lilley AK & Bailey MJ (1997) Impact of plasmid pQBR103 acquisition and carriage on the phytosphere fitness of *Pseudomonas fluorescens* SBW25: burden and benefit. *Applied and Environmental Microbiology* **63**: 1584-1587.
- Linares JF, Gustafsson I, Baquero F & Martinez JL (2006) Antibiotics as intermicrobial signaling agents instead of weapons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**: 19484-19489.
- Liu B & Pop M (2009) ARDB-Antibiotic Resistance Genes Database. *Nucleic Acids Research* **37**: D443-D447.
- Lombard N, Prestat E, van Elsas JD & Simonet P (2011) Soil-specific limitations for access and analysis of soil microbial communities by metagenomics. *Fems Microbiology Ecology* **78**: 31-49.
- Marti R, Scott A, Tien YC, Murray R, Sabourin L, Zhang Y & Topp E (2013) Impact of manure fertilization on the abundance of antibiotic-resistant bacteria and frequency of detection of antibiotic resistance genes in soil and on vegetables at harvest. *Applied and Environmental Microbiology* **79**: 5701-5709.
- Martinez JL (2009) Environmental pollution by antibiotics and by antibiotic resistance determinants. *Environmental Pollution* **157**: 2893-2902.

- Mathews S & Reinhold D (2013) Biosolid-borne tetracyclines and sulfonamides in plants. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **20**: 4327-4338.
- McDermott W & Rogers DE (1982) Social ramifications of control of microbial disease. *Johns Hopkins Medical Journal* **151**: 302-312.
- Michellini L, Reichel R, Werner W, Ghisi R & Thiele-Bruhn S (2012) Sulfadiazine uptake and effects on *Salix fragilis* L. and *Zea mays* L. plants. *Water Air and Soil Pollution* **223**: 5243-5257.
- Molbak L, Molin S & Kroer N (2007) Root growth and exudate production define the frequency of horizontal plasmid transfer in the rhizosphere. *Fems Microbiology Ecology* **59**: 167-176.
- Monteiro SC & Boxall ABA (2010) Occurrence and Fate of Human Pharmaceuticals in the Environment. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, Vol. 202 (Whitacre DM, ed.^eds.), p.^pp. 53-154. Springer, New York.
- Montforts M, Kalf DF, van Vlaardingen PLA & Linders J (1999) The exposure assessment for veterinary medicinal products. *Science of the Total Environment* **225**: 119-133.
- Musovic S, Dechesne A, Sørensen J & Smets BF (2010) Novel assay to assess permissiveness of a soil microbial community toward receipt of mobile genetic elements. *Applied and Environmental Microbiology* **76**: 4813-4818.
- Musovic S, Klumper U, Dechesne A, Magid J & Smets BF (2014) Long-term manure exposure increases soil bacterial community potential for plasmid uptake. *Environmental Microbiology Reports* **6**: 125-130.
- Nakamura Y, Itoh T, Matsuda H & Gojobori T (2004) Biased biological functions of horizontally transferred genes in prokaryotic genomes. *Nature Genetics* **36**: 760-766.
- Nichols D (2007) Cultivation gives context to the microbial ecologist. *Fems Microbiology Ecology* **60**: 351-357.
- Normark BH & Normark S (2002) Evolution and spread of antibiotic resistance. *Journal of Internal Medicine* **252**: 91-106.
- Nowara A, Burhenne J & Spiteller M (1997) Binding of fluoroquinolone carboxylic acid derivatives to clay minerals. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **45**: 1459-1463.
- Oades JM (1993) The role of biology in the formation, stabilization and degradation of soil structure. *Geoderma* **56**: 377-400.
- Osborn AM, Tatley FMD, Steyn LM, Pickup RW & Saunders JR (2000) Mosaic plasmids and mosaic replicons: evolutionary lessons from the analysis of genetic diversity in IncFII-related replicons. *Microbiology* **146**: 2267-2275.
- Pasteur L & Joubert J (1877) Charbon et septicemia. *Cr. Acad. Sci. Paris* **85**: 101-115.
- Perreten V & Boerlin P (2003) A new sulfonamide resistance gene (*sul3*) in *Escherichia coli* is widespread in the pig population of Switzerland. *Antimicrob. Agents and Chemother.* **47**: 1169-1172.
- Pignatello JJ & Xing BS (1996) Mechanisms of slow sorption of organic chemicals to natural particles. *Environmental Science & Technology* **30**: 1-11.
- Poulsen PHB, Abu Al-Soud W, Bergmark L, Magid J, Hansen LH & Sorensen SJ (2013) Effects of fertilization with urban and agricultural organic wastes in a field trial - prokaryotic diversity investigated by pyrosequencing. *Soil Biology & Biochemistry* **57**: 784-793.
- Prado T, Pereira WC, Silva DM, Seki LM, Carvalho APD & Asensi MD (2008) Detection of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in effluents and sludge of a hospital sewage treatment plant. *Letters in Applied Microbiology* **46**: 136-141.

- Radstrom P & Swedberg G (1988) RSF1010 and a conjugative plasmid contain *sulII*, one of two known genes for plasmid-borne sulfonamide resistance dihydropteroate synthase. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **32**: 1684-1692.
- Reichel R, Rosendahl I, Peeters E, *et al.* (2013) Effects of slurry from sulfadiazine- (SDZ) and difloxacin- (DIF) medicated pigs on the structural diversity of microorganisms in bulk and rhizosphere soil. *Soil Biology & Biochemistry* **62**: 82-91.
- Ricci JCD & Hernandez ME (2000) Plasmid effects on *Escherichia coli* metabolism. *Critical Reviews in Biotechnology* **20**: 79-108.
- Roberts MC (2012) Mechanisms of bacterial antibiotic resistance and lessons learned from environmental tetracycline resistant bacteria. *Antimicrobial resistance in the environment*, Keen PL & Montforts MHMM, 93-121, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey.
- Rosendahl I, Siemens J, Groeneweg J, *et al.* (2011) Dissipation and sequestration of the veterinary antibiotic sulfadiazine and its metabolites under field conditions. *Environ. Sci. Technol.* **45**: 5216-5222.
- Rosendahl I, Siemens J, Kindler R, *et al.* (2012) Persistence of the fluoroquinolone antibiotic difloxacin in soil and lacking effects on nitrogen turnover. *Journal of Environmental Quality* **41**: 1275-1283.
- Sambrook J, Fritsch EF & Maniatis T (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Sarmah AK, Meyer MT & Boxall ABA (2006) A global perspective on the use, sales, exposure pathways, occurrence, fate and effects of veterinary antibiotics (VAs) in the environment. *Chemosphere* **65**: 725-759.
- Schauss K, Focks A, Heuer H, *et al.* (2009) Analysis, fate and effects of the antibiotic sulfadiazine in soil ecosystems. *Trac-Trends in Analytical Chemistry* **28**: 612-618.
- Schlüter A, Krahn I, Kollin F, *et al.* (2007) IncP-1 beta plasmid pGNB1 isolated from a bacterial community from a wastewater treatment plant mediates decolorization of triphenylmethane dyes. *Applied and Environmental Microbiology* **73**: 6345-6350.
- Scholz P, Haring V, Wittmannliebhold B, Ashman K, Bagdasarian M & Scherzinger E (1989) Complete nucleotide-sequence and gene organization of the broad host-range-plamid RSF1010. *Gene* **75**: 271-288.
- Schwaner NE & Kroer N (2001) Effect of plant species on the kinetics of conjugal transfer in the rhizosphere and relation to bacterial metabolic activity. *Microbial Ecology* **42**: 458-465.
- Sengelov G, Agerso Y, Halling-Sorensen B, Baloda SB, Andersen JS & Jensen LB (2003) Bacterial antibiotic resistance levels in Danish farmland as a result of treatment with pig manure slurry. *Environment International* **28**: 587-595.
- Seo MD, Won HS, Kim JH, Mishig-Ochir T & Lee BJ (2012) Antimicrobial peptides for therapeutic applications: A Review. *Molecules* **17**: 12276-12286.
- Sittig S, Kasteel R, Groeneweg J & Vereecken H (2012) Long-term sorption and sequestration dynamics of the antibiotic sulfadiazine: a batch study. *J. Environ. Qual.* **41**: 1497-1506.
- Sjolund M, Bonnedahl J, Hernandez J, *et al.* (2008) Dissemination of multidrug-resistant bacteria into the Arctic. *Emerging Infectious Diseases* **14**: 70-72.
- Sköld O (2000) Sulfonamide resistance: mechanisms and trends. *Drug Resistance Updates* **3**: 155-160.
- Sköld O (2001) Resistance to trimethoprim and sulfonamides. *Veterinary Research* **32**: 261-273.
- Smalla K & Sobecky PA (2002) The prevalence and diversity of mobile genetic elements in bacterial communities of different environmental habitats: insights gained from different methodological approaches. *Fems Microbiology Ecology* **42**: 165-175.

- Smalla K, Van Overbeek LS, Pukall R & Van Elsas JD (1993) Prevalence of NPTII and TN5 in Kanamycin-resistant bacteria from different environments. *Fems Microbiology Ecology* **13**: 47-58.
- Smalla K, Heuer H, Götz A, Niemeyer D, Krögerrecklenfort E & Tietze E (2000) Exogenous isolation of antibiotic resistance plasmids from piggery manure slurries reveals a high prevalence and diversity of IncQ-like plasmids. *Applied and Environmental Microbiology* **66**: 4854-4862.
- Smalla K, Wieland G, Buchner A, *et al.* (2001) Bulk and rhizosphere soil bacterial communities studied by denaturing gradient gel electrophoresis: Plant-dependent enrichment and seasonal shifts revealed. *Applied and Environmental Microbiology* **67**: 4742-4751.
- Smets BF & Barkay T (2005) Horizontal gene transfer: Perspectives at a crossroads of scientific disciplines. *Nature Reviews Microbiology* **3**: 675-678.
- Smith DL, Dushoff J & Morris JG, Jr. (2005) Agricultural antibiotics and human health. *PLoS Med* **2**: e232.
- Srinivasan P, Sarmah AK & Manley-Harris M (2013) Co-contaminants and factors affecting the sorption behaviour of two sulfonamides in pasture soils. *Environmental Pollution* **180**: 165-172.
- Sundström L, Radstrom P, Swedberg G & Skold O (1988) Site-specific recombination promotes linkage between trimethoprim resistance and sulfonamide resistance genes - sequence characterization of dhfrV and sull and a recombination active locus of Tn21. *Molecular & General Genetics* **213**: 191-201.
- Tappe W, Herbst M, Hofmann D, Koepchen S, Kummer S, Thiele B & Groeneweg J (2013) Degradation of sulfadiazine by *Microbacterium lacus* strain SDZm4 isolated from lysimeters previously manured with slurry from sulfadiazine medicated pigs. *Applied and Environmental Microbiology* **79**: 2572-2577.
- ter Laak TL, Gebbink WA & Tolls J (2006a) The effect of pH and ionic strength on the sorption of sulfachloropyridazine, tylosin, and oxytetracycline to soil. *Environmental Toxicology and Chemistry* **25**: 904-911.
- ter Laak TL, Gebbink WA & Tolls J (2006b) Estimation of soil sorption coefficients of veterinary pharmaceuticals from soil properties. *Environmental Toxicology and Chemistry* **25**: 933-941.
- Thiele-Bruhn S (2005) Microbial inhibition by pharmaceutical antibiotics in different soils - dose-response relations determined with the iron(III) reduction test. *Environ. Toxicol. Chem.* **24**: 869-876.
- Thiele-Bruhn S & Aust MO (2004) Effects of pig slurry on the sorption of sulfonamide antibiotics in soil. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **47**: 31-39.
- Thomas CM (2000) Paradigms of plasmid organization. *Molecular Microbiology* **37**: 485-491.
- Thomas CM & Nielsen KM (2005) Mechanisms of, and barriers to, horizontal gene transfer between bacteria. *Nature Reviews Microbiology* **3**: 711-721.
- Topp E, Chapman R, Devers-Lamrani M, *et al.* (2013) Accelerated biodegradation of veterinary antibiotics in agricultural soil following long-term exposure, and isolation of a sulfamethazine-degrading *Microbacterium* sp. *Journal of Environmental Quality* **42**: 173-178.
- van Elsas JD, Turner S & Bailey MJ (2003) Horizontal gene transfer in the phytosphere. *New Phytologist* **157**: 525-537.
- van Elsas JD, Gardener BBM, Wolters AC & Smit E (1998) Isolation, characterization, and transfer of cryptic gene-mobilizing plasmids in the wheat rhizosphere. *Applied and Environmental Microbiology* **64**: 880-889.

- van Overbeek LS, Wellington EMH, Egan S, *et al.* (2002) Prevalence of streptomycin-resistance genes in bacterial populations in European habitats. *Fems Microbiology Ecology* **42**: 277-288.
- Versalovic J, De Bruijn FJ & Lupski JR (1998) *Repetitive sequence-based PCR (rep-PCR) DNA fingerprinting of bacterial genomes*. Chapman and Hall, Inc., 29 West 35th Street, New York, New York, USA 2-6 Boundary Row, London SE1 8HN, England.
- Vuillemin P (1889) Antibiose et symbiose. *CR assoc. Fr. Av. Sci.* **2**: 525-543.
- Wackernagel W, Sikorski J, Blum S, Lorenz MG & Graupner S (1998) *Natural genetic transformation of bacteria in soil*. Chapman and Hall Ltd., 2-6 Boundary Row, London
- Walsh TR (2006) Combinatorial genetic evolution of multiresistance. *Current Opinion in Microbiology* **9**: 476-482.
- Wehrhan A, Streck T, Groeneweg J, Vereecken H & Kasteel R (2010) Long-term sorption and desorption of sulfadiazine in soil: experiments and modeling. *Journal of Environmental Quality* **39**: 654-666.
- Weinert N, Meincke R, Gottwald C, *et al.* (2009) Rhizosphere communities of genetically modified Zeaxanthin-accumulating potato plants and their parent cultivar differ less than those of different potato cultivars. *Applied and Environmental Microbiology* **75**: 3859-3865.
- Wellington EMH, Boxall ABA, Cross P, *et al.* (2013) The role of the natural environment in the emergence of antibiotic resistance in Gram-negative bacteria. *Lancet Infectious Diseases* **13**: 155-165.
- Widmer F, Seidler RJ & Watrud LS (1996) Sensitive detection of transgenic plant marker gene persistence in soil microcosms. *Molecular Ecology* **5**: 603-613.
- World Health Organization (2014) Antimicrobial resistance: global report on surveillance. www.who.int ISBN 978 992 974 156474 156478.
- Yim G, Thaker MN, Koteva K & Wright G (2014) Glycopeptide antibiotic biosynthesis. *Journal of Antibiotics* **67**: 31-41.
- Young IM & Crawford JW (2004) Interactions and self-organization in the soil-microbe complex. *Science* **304**: 1634-1637.
- Yu YL, Chen YX, Luo YM, Pan XD, He YF & Wong MH (2003) Rapid degradation of butachlor in wheat rhizosphere soil. *Chemosphere* **50**: 771-774.
- Zarfl C, Klasmeier J & Matthies M (2009) A conceptual model describing the fate of Sulfadiazine and its metabolites observed in manure-amended soils. *Chemosphere* **77**: 720-726.
- Zaslloff M (2002) Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* **415**: 389-395.

7 Danksagung

Die Dissertationsschrift ist nun endlich fertig! Ich möchte diese Gelegenheit nutzen, um mich bei den vielen Personen zu bedanken, die mich, in allen erdenklichen Formen, unterstützt haben und mir somit diesen Moment erst ermöglichten.

Mein erster Dank gilt meiner Doktormutter, Kornelia Smalla, für ihre einzigartige, mit Engelsgeduld ausgestattete Begleitung meiner Promotion. Trotz: irreführender Spontanübersetzungen, Räume und Flure flutender Vergesslichkeiten sowie etlicher Sportunfälle überstanden wir doch: Krampfanfall auslösende Verteidigungen, spontane Stadtbesichtigungen und jegliche Studentenpraktika immer in kompetenter und lächelnder Art und Weise. Ihr stetes Vertrauen und ihr Rückhalt haben mich viel über die Biologie hinaus gelehrt.

Mein zweiter Dank gilt Holger Heuer, meinem Post-Doc, der mich in der ersten Phase meines Projekts begleitete. Er stand mir stets mit wahnsinnig produktiven deduktischen Analysen meiner Ergebnisse sowie einer unzerstörbaren und ansteckenden Ruhe zur Seite. Sein Haupt-Motivations-Motto für Doktoranden nach langen produktiven Sitzungen werde ich nie vergessen: „Das wird doch eh nichts!“.

Wenn ich im Zusammenhang mit der Verfassung dieser Dissertation Churchills Worte von Blut und Tränen bemühe, ist Sven Jechalke, mein zweiter Post-Doc, derjenige, der am ehesten weiß warum, und womöglich ist er der zweite Mensch, den die endlosen Korrekturen dieser Arbeit zwischenzeitlich ähnlich genervt haben. Mit seiner ewig guten Laune, seiner unverrückbaren Zuversicht, seinem Humor und nicht zuletzt seinem Vertrauen war er mir immer eine große Stütze, zwischenzeitlich meine letzte Brücke. Zu den endlosen Literaturtipps, der Lehre der deutschen Rechtschreibung, der Einführung in kluge Internetseiten, den ständigen preußisch korrekten Korrekturen kamen schöne Abende mit ihm und Malmar und nicht zuletzt eine neue Waschmaschine. Für alles ein großes und lautes Danke! Das war großartig!

Der DFG möchte ich an dieser Stelle für die Möglichkeit und Finanzierung dieser Arbeit danken. Ich hoffe, dass das in mich gesetzte Vertrauen mit der Beteiligung an

sieben Veröffentlichungen, einigen Tagungsbeiträgen und dieser Dissertation erfüllt wurde.

Allen meinen Institutskollegen gebührt mein Dank. Ich fühlte mich von der ersten bis zur letzten Minute immer ein wenig wie Zuhause. Ich hatte stets ein offenes Ohr oder helfende Hände zur Verfügung, wenn es vonnöten war, obwohl ich des öfteren durch lautstarkes Lachen oder Güllewolken im Institutsgebäude negativ aufgefallen bin. Ihr wart eine super Truppe.

Einige meiner Teamkollegen müssen hier hervorgehoben werden.

Ellen Krögerrecklenfort, die Mutter des Southern Blottings und mit Abstand die beste Schule für Laborordnung und Selbstorganisation im Labor. Diese Fähigkeiten gepaart mit einem liebevollen Charakter machten das Arbeiten oft einfach. Auch bei einem gefluteten Entwicklerraum. Danke!

Frau Jungkurt danke ich für ihre Geduld bei der wiederholten und unbestechlichen Ausbügung meiner Rechtschreibfehler.

Vio gebührt an dieser Stelle Dank nicht nur aufgrund der etlichen Liter DNA, die sie für mich und das Projekt gewonnen hat, sondern auch für ihre ewig ehrliche und klärende Art, die mich des öfteren hat das Labor klüger verlassen lassen als ich es betrat.

Ding, mein Mitstreiter und Leidensgenosse. Ich danke ihm für die vielen unglaublichen statistischen Analysen sowie seine Kapazitäten, mir die Maschine namens Computer näher zu bringen. Dazu kamen wundervolle Ausflüge mit dem Bike oder eine Geburtstagswanderung auf den Brocken. Dank ihm trage ich einen Fahrradhelm, weshalb ich ihm wahrscheinlich auch an dieser Stelle für mein Leben danken muss.

Nicht zuletzt erwähnt seien die beiden guten Geister aus dem Gewächshaus.

Jens Ripken, meine letzte (und erste) Linie der Verteidigung gegen die Computer und das Internet. Ich danke ihm für die unzähligen gelösten technischen Probleme auf dem Weg meiner Promotion, die ich sogar mit ihm im Bismarck Bahnhof in Hannover besprechen konnte.

Der zweite gute Geist war Wolfgang Dichtl, immer mit Kopf und Hand sowie einigen Paketen Kaffee zur Stelle. Dafür und für meine rundum komplett deluxe Betreuung während meiner Zeit im Gewächshaus sowie der aktiven Bekämpfung der Institutsflurflutung danke ich ihm.

An dieser Stelle möchte ich allen Studenten und Praktikanten sowie Gästen danken. (Zumindest denen, die ordentlich gearbeitet haben und mir nicht 24 Säcke zum Autoklavieren überließen). Es war eine gute Zeit und ich habe auch viel gelacht.

Meinem Sporttrainer, Christoph Keller, sowie seiner Familie gebührt mein Dank für etliche Stunden des physischen Ausgleichs. Sei es auf dem Fahrrad im Harz oder auf dem Wackelgerüst lackierend am Hausdach. Er hatte für mich immer zu tun und darüber hinaus noch häufiger Zeit und Geduld für meine Sorgen. Danke schön!

Meine Männer-Donnerstags-Abends-Kochrunde: Axel Biehl, Mario Düfer, Tobias Weinert und Jens Koch. Danke für die hunderte spirituell erfrischenden Abende, die dutzenden Konzert- bzw. Festival-Ausflüge sowie D3 Sessions und nicht zuletzt die Kochrezepte. Aber ihr wisst ja: „Irgendwas ist immer!“

Marcel Graf und Heiko Lerche, meine besten. Seit Jahrzehnten meine Felsen in der Brandung, meine Feuerwehr, mein Team, meine Vattos. Ohne Skiurlaube, Rocksessions und Rollenspielabende mit euch wäre das Leben nur halb so lustig. Gut, dass es euch gibt! Und nicht vergessen: „Haben ist besser als brauchen!“

Andrea Delekate danke ich für eine sehr schöne Zeit und ihre Präsenz in meinem Vordiplom. Was ich von ihr damals lernte, hat mir maßgeblich durch das Studium geholfen und mich somit zu dieser Dissertation gebracht.

Der Brain GmbH, namentlich Joachim Berger, Ulrich Schwanke und nicht zuletzt Kay Effenberger danke ich für die jahrelange gute Zusammenarbeit auch in den wildesten Nächten. Ihr habt das Kulturleben in dieser Stadt immer für mich aufgehübscht, Danke!

Jost Daemmgen, dir danke ich für die unzähligen Momente, sei es als Freund, Helfer, Lehrer und Vorbild; du bist mir ein Bruder, von A bis Z. Angefangen mit der Näherbringung einer vorbildlichen amerikanischen patriotischen Haltung bis hin zur Unimog Tour durch Island. Ohne deine Geduld und baumeisterischen Fähigkeiten wäre ich nie bis hier her gekommen.

Last but not least danke ich meiner Familie, Marco Schwarz, Svenja Stoffel und Dieter Hoke, für ihre ständige und nie hinterfragte Unterstützung meines Plans. Ohne euch hätte es nie geklappt!

Der mit Abstand größte Dank gebührt meiner Mutter, Erika Hoke. Sie hat mich zu dem Menschen gemacht, der ich bin. Sie hat mich von Anfang an begleitet und unterstützt, mit mir jede Krise gemeistert, bis hin zu dieser Dissertation.

Ihre Hilfe war immer absolut, unbedingt und umfassend.

Kurzum: Ich danke dir für alles, du bist die Beste!

8 Abkürzungen

ABRG	Antibiotikaresistenzgen
BS	Bulk soil, nicht durchwurzelter Boden
bzw.	beziehungsweise
DFG	Deutsche Forschungsgemeinschaft
DGGE	denaturierende Gradientengelelektrophorese
DHPS	Dihydropteroinsäure
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EAS	easily extractable fraction, einfach zu extrahierende Fraktion
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ESBL	extended spectrum beta lactamase
EU	Europäische Union
GFP	grün fluoreszierendes Protein
GM	Gentamicin
HGT	horizontaler Gentransfer
IS	insertion sequence
ISCR	insertion sequence common region
Km	Kanamycin
LB	Luria Bertani
MGE	mobile genetische Elemente
N-Ac-SDZ	N-Acetyl Sulfadiazin
OTU	operational taxonomic unit
PBPs	penicillinbindende Proteine
PCR	Polymerase Chain Reaction, Polymerase-Kettenreaktion
RES	residual fraction, Residualfraktion
RH	Rhizosphere
Rif	Rifampicin
RNA	Ribonukleinsäure
rrn	16S rRNA, 16S Untereinheit der ribosomalen Ribonukleinsäure
S	Streptomycin
SDZ	Sulfadiazin
TF	Transferfrequenz
TK	Transkonjugant
tRNA	Transport-Ribonukleinsäure
u.a.	unter anderem
WHO	World Health Organisation
z.B.	zum Beispiel